

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**



**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN  
FUNCIONAL DE VARIANTES GENÉTICAS DE  
PROTEÍNAS DEL COMPLEMENTO ASOCIADAS  
CON APTOLOGÍA.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Rubén Martínez Barricarte**

Bajo la dirección del doctor

Santiago Rodríguez de Córdoba

**Madrid, 2011**

**ISBN: 978-84-694-2681-4**

**© Rubén Martínez Barricarte, 2011**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**



**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE  
VARIANTES GENÉTICAS DE PROTEÍNAS DEL  
COMPLEMENTO ASOCIADAS CON PATOLOGÍA.**

Memoria presentada por

**RUBÉN MARTÍNEZ BARRICARTE**

Para optar al grado de Doctor.

Dirigida por

**SANTIAGO RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA**

Profesor de Investigación

**Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC.**



Octubre de 2010



SANTIAGO RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA, Doctor en Biología, Profesor de Investigación del CSIC en el Centro de Investigaciones Biológicas:

CERTIFICA: Que **DON RUBÉN MARTÍNEZ BARRICARTE** ha realizado bajo su dirección el trabajo de tesis Doctoral que lleva por título: **IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE VARIANTES GENÉTICAS DE PROTEÍNAS DEL COMPLEMENTO ASOCIADAS CON PATOLOGÍA.**

El trabajo que se presenta es original y de relevancia en las áreas de la Genética y Patología Molecular Humana. Los objetivos planteados en esta Tesis han sido profundizar en el conocimiento de los factores genéticos de predisposición a aHUS y DDD y en el de los mecanismos patogénicos responsables de estas patologías. El trabajo de tesis que presenta Rubén Martínez Barricarte ha dado ya lugar a varias publicaciones en revistas internacionales de alto índice de impacto. Por todo ello considero que el trabajo de tesis presentado por Rubén Martínez Barricarte para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad Complutense de Madrid tiene la debida calidad para su defensa y calificación.

Fdo: Prof. Santiago Rodríguez de Córdoba







*"Daría todo lo que sé por la mitad de lo que ignoro"*  
*(René Descartes)*

---

**"Hasta el infinito y más allá"**  
**(Buzz Lightyear, Toy Story)**



## Agradecimientos

Desde el comienzo de esta tesis han sido muchísimas las personas que han contribuido a que estos 4 años se hayan convertido en algo inolvidable y a los cuales me gustaría agradecerse.

En primer lugar, a Santiago, por haber tenido la paciencia suficiente para introducirme en el mundo de la ciencia, haber sabido motivarme como nadie además de haber estado siempre disponible para todo lo que ha hecho falta.

Como no, a mi familia de Navarra, en especial a mis padres, mi hermano, mi abuela y los de Azagra que, a pesar de que al principio no entendieron muy bien que me fuese de su vera camino a la gran ciudad, me han brindado en todos los sentidos un apoyo incondicional. A Sergio, que no es de la familia pero como si lo fuera, con quien empecé esta "aventura" y ha estado a mi lado contra viento y marea... y menos mal!

Esta tesis no habría sido posible sin la gente del labo, comenzando por Elena Goico con quien di mis primeros coletazos, Olga y Silvana mis correctoras de tesis y compañeras de "confidencias", Agustín el padre del año con el que he compartido todos los congresos, Ángela que aunque no nos aguantamos tampoco nos llevamos tan mal, Sheila el azote del desorden, Tamara con sus ratones y su "achuwoiki", Javi al que aunque le hayan quitado el carnet de navarro siempre te cuenta un chiste para que se te olvide, Laura la valenciana con todo lo que ello conlleva, Belén, Arturo... y toda la gente con la que he coincidido y con los que he compartido horas y horas de trabajo, agobios y risas. Además, me gustaría agradecer a nuestros colaboradores de Cardiff, los miembros de Secugen, los grupos del Hospital Universitario de La Paz y el grupo de Oscar Llorca aquí en el CIB por su ayuda inestimable sin la cual esta tesis habría sido mucho más pobre.

A mis "niñas" (y ahora algún niño) del laboratorio de las Cristinas y Ángela, tanto a las que están como las que ya se han ido, por todo lo que hemos compartido tanto dentro como fuera del centro y por toda vuestra ayuda cuando más me ha hecho falta. Sin vosotras el día a día no habría sido lo mismo y sin duda, vaya donde vaya, va a ser de lo que mas eche de menos de estos años.

No podía faltar la rubia (Fátima), que decir que no sepa, muchísimas gracias por todo, y lo digo solo

en una palabra porque si entro en detalle podría llenar páginas enteras.

A la gente del pasillo, Gelis, Titos, Teixis, los de José Alberto y los de Jesús del Mazo y dentro de estos, Javi que intentaba (sin éxito) estornudar más fuerte que yo, Mercedes, que me subía la moral en cuanto me veía por la mañana, Evita, Jesús y Pablo con los que entré de la mano y que parece que ya nos estamos haciendo mayores, Rubén que pese a que le faltan dos genes es buen chaval, los dos Davides, Sergio del que no voy a decir nada porque ya lo sabe o porque sino su intuición se lo dirá, y a todos los demás que hacen del día a día algo mas agradable.

Por supuesto al resto de becarios del CIB muchas gracias por los partidos de futbol, las casas rurales, las cañas de los jueves, las cenas de Navidad, las fiestas de primavera y por hacer que aun llegando desde fuera de Madrid me sintiese como en casa. Mención especial merecen Rodrigo, Carlos y Mikel que se han encargado con el sudor de su frente de organizar muchos de tan marcados eventos, Elisa y el "desayuno con diamantes", Ana Cris, que si después del 5-0 no la nombro en estas líneas no se lo que me hace, Eva sin la cual aún estaría buscando los impresos para depositar esta tesis, Darío al que además tuve que "aguantar" dos años en el piso, Laura, Mateo y el resto de las Corbís, Maripaz, Isabel, Marta, María, Carlos, Rafa, Kike... y toda la gente con la que he convivido en el centro estos años.

A mi gente de Pamplona que me han apoyado desde la distancia, a Isaac "el actor" que se dio cuenta que no podía vivir sin mí y se mudo dos meses después de que lo hiciese yo, a Leire que ha estado disponible para firmar informes, ir de viaje, s.m.s. extra largos y todo lo que ha hecho falta, a los compañeros de la universidad que se mudaron para aquí, las chicas del CNIO, Asun... y a Natalio que ha hecho el esfuerzo de venir desde Bilbao para este día.

Al resto de la gente que he conocido en Madrid, como los de waterpolo, a Patri, mis compañeros de piso, Ángela, Belén, Mónica... por aceptarme como a uno más.

A la comunidad de Madrid por subvencionarme estos 4 años de trabajo.

Finalmente a toda esa gente que por una razón o por otra se me ha pasado nombrar en estas líneas pero que saben que se merecen un hueco.



# Índice

## Índice

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
- El sistema del complemento	4
1. Activación del sistema del complemento	4
1.1. Activación de la vía clásica	4
1.2. Activación de la vía de las lectinas	5
1.3. Activación de la vía alternativa	5
2. Fase lítica	5
3. Activadores de la AP del complemento	7
3.1. C3: el activador principal del complemento	7
3.2. Factor B	8
3.3. Properdina	9
4. La regulación del sistema del complemento	9
4.1. Factor H	11
4.1.1. FHL1	11
4.1.2. FHR1-5	11
4.2. C4BP	12
4.3. CR1	12
4.4. MCP	12
4.5. DAF	12
- Asociación del complemento con patología	13
1. aHUS	13
2. DDD	15
<b>OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
<b>RESULTADOS, MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>21</b>
- La mutación R1210C en factor H del complemento está asociada con el síndrome hemolítico urémico atípico	23
- Falta de asociación entre polimorfismos en la proteína de unión a C4 con el síndrome hemolítico urémico atípico en población española	33
- La variante alotípica de factor H de protección para enfermedad lle62 muestra afinidad por C3b aumentada que favorece su actividad cofactora	41
- La caracterización de las proteínas factor H relacionadas en plasma revela nuevas variantes genéticas de <i>CFHR1</i> asociadas con síndrome hemolítico urémico atípico	53
- Identificación de una mutación FHR5 en pacientes de origen chipriota con glomerulonefritis	65
- Una mutación en C3 humano revela mecanismos patogénicos de la enfermedad por depósito denso y ofrecen información adicional sobre la activación o	

regulación del complemento	75
- Polimorfismos comunes en C3, factor B y factor H colaboran para determinar la actividad del complemento y el riesgo a enfermedad	101
- Resultados adicionales	119
1. rs11120218 del promotor de C4BPB	119
2. Reordenamientos CFH-CFHR1-5	119
3. Mutación en properdina	119
4. Mutaciones en C3	120
5. Secuenciación del exón 6 de DAF	123
<b>DISCUSIÓN</b>	125
- Búsqueda de nuevos genes candidatos	126
1 Región CFH-CFHR1-5	126
1.1 Nuevos reordenamientos	126
1.1. Auto-anticuerpos anti-fH	127
1.1. FHR1	127
1.1. Nefropatía CFHR5	128
2. DAF	128
3. C4BP	128
4. Activadores de la AP del complemento	129
4.1. Properdina	129
4.2. C3	129
- Correlación fenotipo-genotipo	131
1. R1210C	131
2. Polimorfismos y “complotipo”	132
- Caracterización funcional de mutaciones en C3	134
1. Caracterización funcional de mutaciones en C3 asociadas con DDD	134
1.1. Desregulación de la AP del complemento	134
1.2. Interacción con los reguladores	135
1.3. Interacción de la convertasa con el sustrato	135
1.4. Terapia	135
2. Caracterización funcional de mutaciones en C3 asociadas con aHUS.	136
<b>CONCLUSIONES</b>	139
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	143
<b>ABREVIATURAS</b>	151
<b>ANEXO</b>	155
- Síndrome hemolítico urémico espontáneo desencadenado por un factor H sin sus dominios de reconocimiento de superficies	157
- El factor H del complemento es expresado en tejido adiposo en asociación con resistencia a insulina	167



## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Esquema de activación y función del complemento	4
Fig. 2. Activación del complemento	6
Fig. 3. Estructura y cambios conformacionales de C3	8
Fig. 4. Activación de C3 e inactivación de C3b	9
Fig. 5. Regulación de AP del complemento	10
Fig. 6. RCA	11
Fig. 7. Región del RCA que contiene los genes <i>CFH</i> y <i>CFHR1-5</i>	12
Fig. 8. Reordenamientos entre <i>CFH</i> y <i>CFHR1-5</i>	14
Fig. 9. El glomérulo renal sano y en patología	15
Fig. 10. Patrones anómalos de MLPA	119
Fig. 11. Familia GN29	119
Fig. 12. Secuencia y MLPA en <i>properdina</i> en H111	120
Fig. 13. Familia y cromatogramas de los pacientes con aHUS con mutaciones en C3	121
Fig. 14. Ensayo de expresión de los mutantes de C3	122
Fig. 15. Actividad cofactora de las mutaciones en C3 asociadas con aHUS	122
Fig. 16. Localización de las mutaciones en C3	136





## Resumen

DDD (Dense Deposit Disease) y aHUS (atypical Hemolytic Uremic Syndrome) son dos enfermedades renales raras con una importante mortalidad y que frecuentemente causan insuficiencia renal terminal. Al inicio de esta Tesis se conocía la asociación de aHUS y DDD con defectos en la activación o regulación de la vía alternativa del complemento, causados por mutaciones y polimorfismos en los genes del complemento. La caracterización funcional de mutaciones asociadas con aHUS había demostrado que estas alteraciones genéticas resultaban en una regulación defectuosa de la activación del complemento sobre las superficies celulares y que el aHUS, por lo tanto, era seguramente consecuencia del daño causado por el complemento en el endotelio de la microvasculatura glomerular. Por otro lado, estudios animales en DDD sugerían que el mecanismo patogénico en DDD es la activación masiva del C3, consecuencia de la desregulación del complemento en fase fluida. Los objetivos planteados en esta Tesis han sido profundizar en el conocimiento de los factores genéticos de predisposición a aHUS y DDD y de los mecanismos patogénicos responsables de estas patologías.

Entre las nuevas variaciones genéticas asociadas a aHUS y DDD descritos en esta Tesis están distintos

reordenamientos, polimorfismos y mutaciones en los genes CFHR1-5. Sin embargo, el descubrimiento más importante en este apartado ha sido la identificación por primera vez de una mutación en el gen C3 asociada con DDD. La caracterización funcional de esta mutación y su comparación con la de otras mutaciones en este mismo gen que se asocian con aHUS ha confirmado que los mecanismos patogénicos de aHUS se corresponden con un defecto de la regulación del complemento en las superficies celulares, mientras que DDD se produce exclusivamente por una desregulación del complemento en fase fluida.

La caracterización funcional de la mutación en C3 asociada con DDD ha sido también muy importante para desentrañar algunos aspectos estructurales de la activación de la convertasa del C3 de la vía alternativa, de su regulación por factor H, MCP o DAF, y de cómo se produce el reconocimiento del sustrato C3 por esta convertasa.

Por último, hemos investigado y confirmado la relevancia de la hipótesis de los *"multiple hits"* (conurrencia de mutaciones y polimorfismos de riesgo), descrita en el laboratorio hace unos años, para explicar la penetrancia incompleta del aHUS entre los portadores de mutaciones en diversos genes del complemento y justificar la heterogeneidad en la manifestación clínica de la patología.



# Introducción

## El sistema del complemento

El complemento fue descrito por primera vez en 1884 por Jules Bordet mediante ensayos en los que añadiendo suero fresco con anticuerpo antibacteriano a una solución con bacterias estas se lisaban. La lisis se inhibía al calentar el suero por encima de 56°C aunque los anticuerpos seguían funcionando ya que las bacterias se aglutinaban. Bordet concluyó que el suero contenía un conjunto de proteínas termosensibles necesarias para la lisis de los patógenos a las que llamó complemento.

Hoy en día se sabe que el sistema del complemento es un conjunto de más de 30 proteínas tanto plasmáticas como de membrana que interaccionan entre ellas y con otras proteínas del sistema inmunitario constituyendo de esta forma, el principal elemento de la respuesta inmunitaria innata y jugando un papel destacado en la adaptativa. Además, el sistema del complemento es una de las partes más importantes del sistema inmunitario al desarrollar las siguientes funciones:

- Lisis del organismo extraño: La activación del complemento sobre las superficies de los patógenos conduce a la formación de un poro lítico conocido como complejo de ataque a la membrana o MAC (Membrane Attack Complex) que los lisa.

- Opsofagocitosis: Cuando este sistema se activa sobre una superficie extraña, se depositan sobre esta componentes del complemento que actúan como opsoninas produciendo su fagocitosis por macrófagos y neutrófilos con receptores específicos.

- Estimulación de la inflamación: Las anafilotoxinas que se producen durante la activación del complemento (C3a, C5a o C4a) actúan sobre los mastocitos, células endoteliales y neutrófilos produciendo la inflamación en la región de activación.

- Solubilización de inmunocomplejos: La unión de algunas proteínas del sistema del complemento a complejos antígeno-anticuerpo produce su solubilización posibilitando su eliminación por fagocitosis.

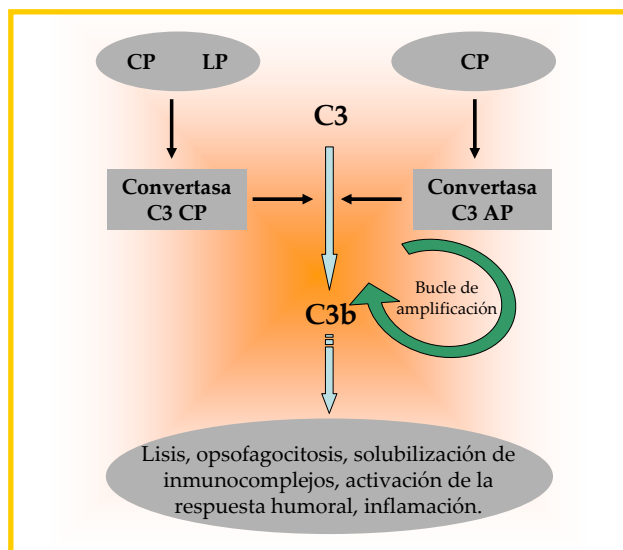
- Modulación de la respuesta mediada por anticuerpos: El fragmento de inactivación de C3, C3d, interacciona con el receptor CR2 (Complement Receptor type 2) de los linfocitos B activándolos y dando lugar así al comienzo de la respuesta inmunitaria humoral.

### 1. Activación del sistema complemento.

Las proteínas del sistema del complemento se

agrupan en 3 vías de activación denominadas: clásica (CP), de las lectinas (LP) y alternativa (AP). La CP y la LP comparten la mayor parte de su cascada de activación excepto el estímulo que las desencadena. En el caso de la CP el desencadenante son anticuerpos unidos a su epítipo, mientras que en el de la LP son residuos de manosa en las superficies de algunos patógenos. Por otra parte, la AP se encuentra constitutivamente activa un nivel basal muy bajo y su activación se exagera en caso de infección.

El punto de convergencia de las tres vías es la activación de C3. Cuando la CP o LP se activa sobre la superficie de un patógeno, se forma un complejo multiprotéico inestable llamado convertasa de C3 de la CP que corta C3 a C3b. El C3b se deposita sobre la superficie del patógeno y forma la convertasa de C3 de la AP, activando más C3 y produciendo una amplificación exponencial sobre esta superficie activadora. A partir de aquí, se van activando y depositando diversas proteínas sobre la superficie hasta la formación del MAC que conduce a la lisis del patógeno. Esta activación también puede tener lugar exclusivamente por acción de la AP al estar constitutivamente activa (**Fig. 1**).



**Fig. 1. Esquema de activación y funciones del complemento.**

Se muestra la parte central de la activación del complemento donde todas las vías forman sus convertasas de C3, que activan C3 a C3b produciendo un bucle de amplificación que conduce a la formación de más convertasa de C3 de la AP sobre la superficie activadora.

#### 1.1. Activación de la vía clásica.

La activación de esta vía se produce cuando varias IgGs o IgMs se unen a C1 a través de sus dominios C<sub>H2</sub> o C<sub>H3</sub> respectivamente. C1 es un complejo multiprotéico de gran tamaño compuesto por las subunidades C1q, C1r y C1s (**Fig. 2**). C1q es la encargada de unir las regiones Fc de los anticuerpos y requiere de la unión de más de una molécula de anticuerpo para su activación. Esto

explica por qué la CP no se activa en plasma y debe esperar a que las IgGs o IgMs se hayan unido a una superficie con varios antígenos, permitiendo el acceso de C1q a dos moléculas de anticuerpo adyacentes. Por otra parte, C1r y C1s tienen función serin-esterasa. En el complejo C1 hay dos moléculas de C1r y otras dos de C1s. Cuando C1 es activado estas enzimas escinden la proteína del complemento C4 en C4a y C4b. C4 tiene un enlace tioéster interno que, cuando esta proteína se activa al pasar a C4b, forma enlaces covalentes amida o éster con lo que se encuentre más cerca que, normalmente, es el complejo-antígeno anticuerpo o la superficie a la que se encuentra unido el anticuerpo.

El C4b adherido a la superficie une C2 que es escindido por una molécula de C1s cercana en C2a, que permanece unido a C4b y C2b que se libera. El complejo C4b2a es la denominada convertasa de C3 de la CP y su función es escindir moléculas de C3 en C3a y C3b. El C3b se unirá a la superficie mediante su enlace tioéster y, formará la convertasa de C3 de la AP que desencadenará en la activación de esta vía sobre la superficie en la que se ha unido inicialmente la IgG o la IgM (Fig. 2).

### 1.2. Activación de la vía de las lectinas.

La activación de la LP es independiente de anticuerpos y se produce cuando una proteína de unión a manosa o MBP (Manose Binding Protein) une algún polisacárido microbiano como lectinas, ficolinas o incluso IgAs presentes en algunos inmunocomplejos (Fig. 2). A esta MBP se unen las proteínas MASP-1, MASP-2 y MASP-3 (MBP:MASP-1/3) que, igual que en el caso de la CP, son capaces de activar C4 para formar la convertasa de C3 de la CP. Además, MASP-2 puede escindir C2 (Holers 2008) y MBP:MASP-1/3 es capaz de activar directamente C3 saltándose la fase de activación de la CP. El complejo MBP:MASP-1/3 se ha descrito que activa la pro-trombina a trombina que, a su vez produce la activación de C5 iniciando la fase lítica (Krurup *et al.* 2007). La LP juega un papel destacado en el periodo del desarrollo entre la pérdida de los anticuerpos maternos y la adquisición de un repertorio maduro (Walport 2001).

### 1.3. Activación de la vía alternativa.

La AP del complemento es la vía filogenéticamente más antigua, aunque recibe este nombre por haber sido descubierta más tarde que la clásica. Su activación, al igual que la LP, es independiente de anticuerpos, encontrándose constitutivamente activa en plasma a muy bajo nivel. Su activación se basa en el paso espontáneo de C3, en muy baja cantidad, a alguna de sus formas activas (C3b e iC3). La molécula de C3 sufre un gran cambio conformacional al activarse permitiéndole unir

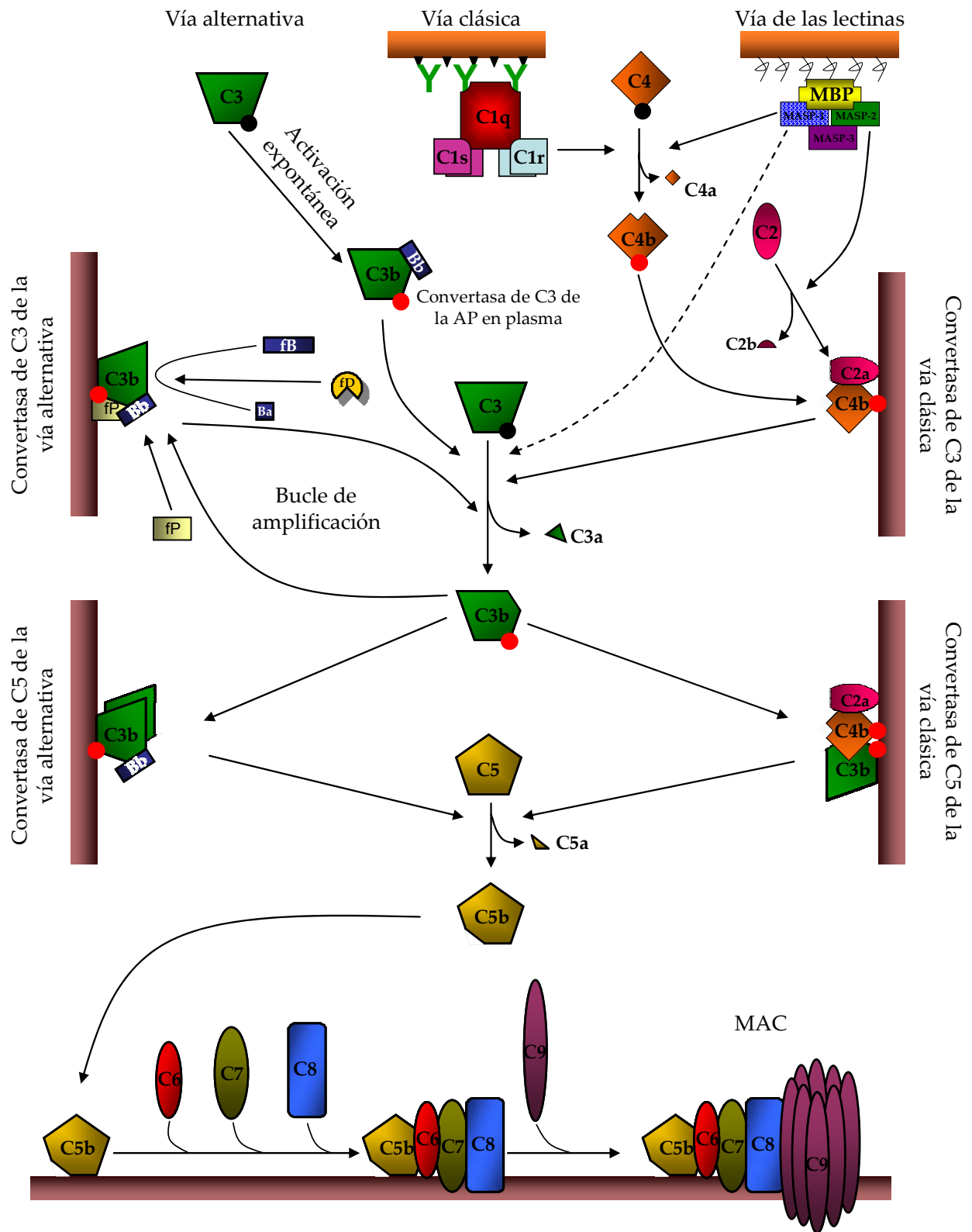
factor B (fB). En este complejo C3bB, llamado proconvertasa, fB es escindido por la proteasa plasmática factor D (fD) en Ba, que se libera del complejo, y Bb que permanece unido formando la convertasa de C3 de la AP del complemento (C3bBb) que, escindirán más moléculas de C3 a C3b (Pangburn *et al.* 1986) (Fig. 2).

La activación de la AP dependerá de la superficie en la que se depositen las formas activas de C3. Si se depositan en superficies propias, o permanecen en el plasma, estas moléculas serán inactivadas inmediatamente por los reguladores del complemento evitando el daño tisular. Por el contrario, si su deposición ocurre en la superficie de patógenos, se formará la convertasa de C3 de la AP sobre ellos. Esta escindirán moléculas de C3 a C3b, que se depositarán igualmente sobre el patógeno produciendo más convertasa de C3 de la AP iniciándose un gran bucle de amplificación que conducirá a la lisis de este. La convertasa de C3 de esta vía es estabilizada por una proteína plasmática llamada properdina, que la hace más resistente a su disociación, conduciendo a una activación más efectiva de la AP del complemento sobre superficies extrañas (Fig. 2).

## 2. Fase lítica.

La fase lítica comienza con la deposición de C5b sobre la superficie activadora (Muller-Eberhard 1986) (Fig. 2). El C5b se produce por escisión de C5 por parte de las convertasas de C5. Tanto la de la vía clásica/lectinas como la de la vía alternativa se producen por la incorporación de una molécula de C3b a las respectivas convertasas de C5. Esta unión cambia las cualidades de las convertasas de C5 que pasan a tener más avidez por C5 en lugar de C3. El C5b se une a la superficie activadora y a éste se une C6, dando el complejo C5b6 sin actividad catalítica. C5b6 está unido a la membrana débilmente, por lo que requiere de la unión de C7 cuyo dominio hidrofóbico se inserta en la bicapa lipídica anclándolo más fuertemente. La siguiente proteína en unirse al complejo es C8, dando C5b678. C8 consta de tres cadenas distintas ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) una de las cuales une el complejo C5b67, otra, hidrofóbica, se inserta en la membrana y la última sirve de lugar de anclaje para el último componente del MAC que se unirá, que es C9. Este componente, es el encargado de formar el poro lítico mediante su polimerización en anillos que se insertan en la bicapa lipídica atravesándola por completo. La primera molécula de C9 se une sobre el complejo C5b678 y a partir de ahí, el resto de las moléculas de C9 polimerizan entre ellas hasta formar el poro lítico en la membrana, produciendo la destrucción del microorganismo.





**Fig. 2. Activación del complemento.** En esta figura se muestra esquemáticamente la activación de las 3 vías de activación del complemento. Se puede observar como todas ellas desencadenan en la formación de sus respectivas convertasas de C3 y C5. El paso final es la formación del MAC. Los puntos negros en las moléculas de C3 y C4 representan el enlace tioéster activo mientras que, el punto rojo indica que ya ha reaccionado. La molécula con el nombre fP representa la properidina.

Los poros líticos tienen un tamaño de unos 100Å y producen la entrada de iones calcio, muy abundantes en el medio extracelular y que en células eucariotas pueden producir apoptosis. También son los causantes de la ruptura de la membrana de los patógenos provocada por la entrada de agua a su través (De Podack 1986; Abbas *et al.* 2000) (**Fig. 2**).

### 3. Activadores de la AP del complemento.

Los activadores de la AP del complemento son las tres moléculas que constituyen su convertasa de C3: fB, properdina y el mismo C3. Para su ensamblaje, fB se une inicialmente a C3b dando el complejo C3bB que recibe el nombre de proconvertasa. En este complejo, fB se encuentra en una conformación diferente con respecto a su forma plasmática, la cual le permite exponer el sitio de corte para fD. Esta proteasa escinde fB en sus fragmentos Ba, que se libera, y Bb que permanece unido a C3b formando la convertasa de C3 de la AP (C3bBb) (Pangburn *et al.* 1986). El complejo es estabilizado por properdina aunque su forma de acción no es totalmente conocida.

#### 3.1. C3: el activador principal del complemento.

C3 es el principal activador de la AP del complemento. Es una proteína de 186 kDa perteneciente al grupo de las  $\alpha$ 2-macroglobulinas con un origen evolutivo anterior incluso al de las inmunoglobulinas. C3 se transcribe como un único mensajero a partir de un gen de 41 exones. Se traduce a una cadena peptídica que en su fase de maduración, antes de ser secretada, se escinde por una secuencia RRRR (668-671) dando la molécula madura formada por dos cadenas peptídicas llamadas  $\alpha$  y  $\beta$ , que se mantienen unidas por puentes disulfuro (**Fig. 3A**).

Estructuralmente consta de (**Fig. 3**) (Janssen *et al.* 2005):

- 8 dominios macroglobulina (MG) que forman un anillo en el centro de la molécula.
- Un "linker" (LNK)
- El dominio anafilotoxina (ANA) que es el que se escinde en la activación de C3 y que también es llamado C3a.
- Un dominio llamado  $\alpha'$ NT (N-terminus of the  $\alpha$ -chain) importante en la formación de la convertasa.
- C345C (Complement C3, C4 and C5 C-terminal) que al igual que  $\alpha'$ NT tiene un papel importante en la formación de la convertasa de C3 de la AP.

- El dominio que contiene el enlace tioéster o TED (Thioéster-Containing Domain).

- El dominio CUB (Complement C1r/C1s, UEGF, BMP1) que une el TED con el resto de la molécula.

C3 sufre grandes cambios conformacionales tras su activación a C3b o iC3 exponiendo las regiones de interacción con fB en los dominios  $\alpha'$ NT y C345C, que le permite formar la convertasa de C3 (**Fig. 3B**). La molécula de C3 consta de un enlace tioéster muy reactivo que se encuentra embebido dentro de una región hidrofóbica de la molécula, para evitar su reacción con agua u otros nucleófilos pequeños. Este tioéster se expone cuando la molécula de C3 se activa, pudiendo formar enlaces covalentes con grupos amino o hidroxilo (este último con más afinidad) de diversas superficies, dirigiendo así la actividad del complemento a una zona determinada.

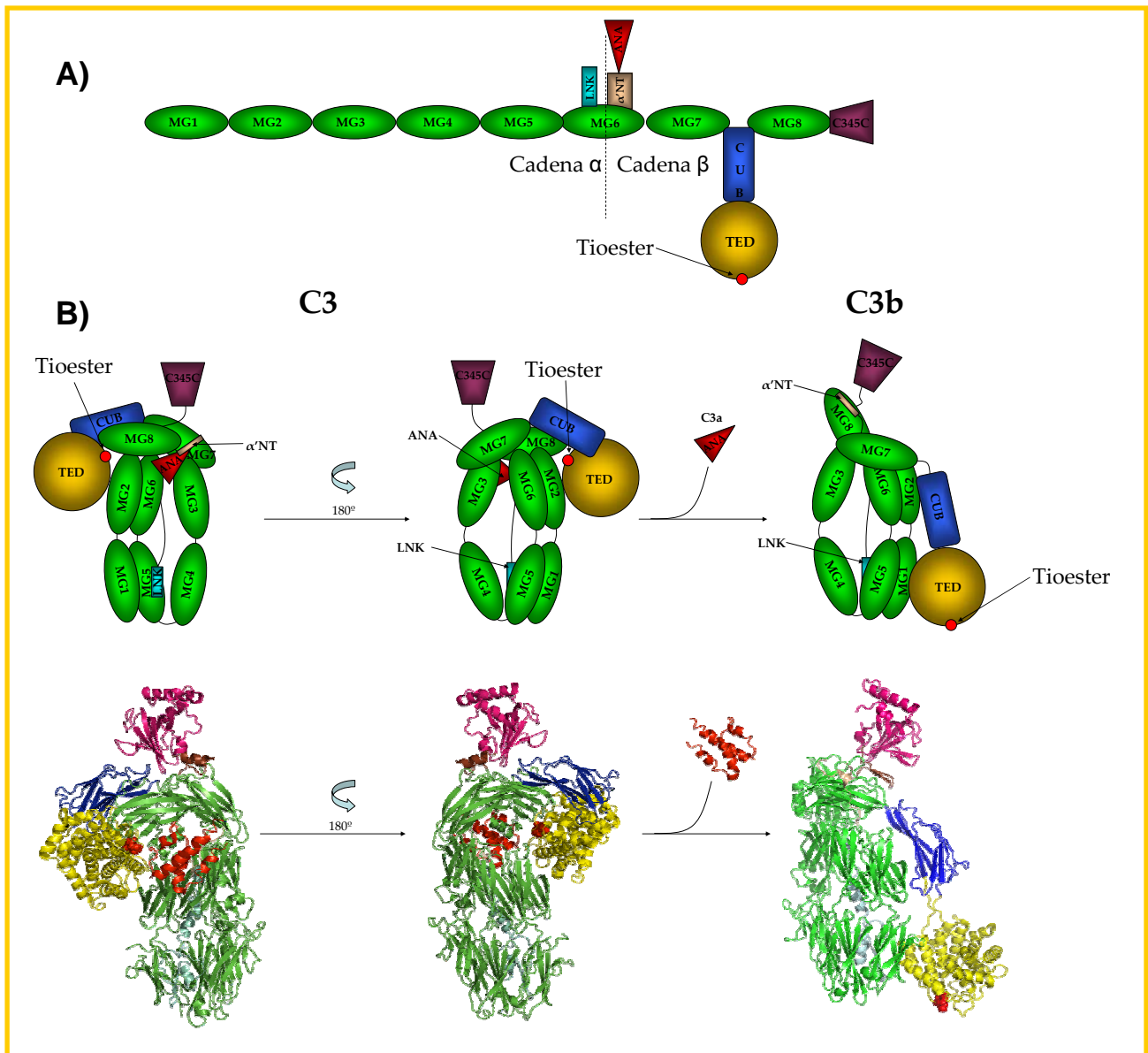
La forma más efectiva de activar el C3 es mediante sus convertasas que escinden el fragmento C3a muy eficazmente. Sin embargo, la AP del complemento, como ya se ha comentado anteriormente, se encuentra constitutivamente activada a un nivel basal muy bajo independiente de estas. Su activación ocurre gracias a que C3 puede pasar a algunas de sus conformaciones activas espontáneamente, a una velocidad muy baja lo que ocurre principalmente por dos procesos:

- Hidrólisis del enlace tioéster por una molécula de agua dando una molécula de iC3 capaz de formar una convertasa de C3 activa, que inicia la activación de la AP (Bexborn *et al.* 2008).

- El C3 circulante puede ser proteolizado por proteasas inespecíficas (FXa, FXIa, trombina, MBL:MASP-1/3 y plasmina) produciendo C3b (Krurup *et al.* 2007; Amara *et al.* 2008).

Además de los lugares de interacción con fB, al activarse C3, también se exponen los sitios de interacción con los distintos reguladores de la AP del complemento, que mantienen su activación en los niveles adecuados en cada momento (Gros *et al.* 2008) (**Fig. 3B**). El hecho de que la mayor parte de la regulación de la AP esté centrada en evitar la aparición de las formas activas de C3 es una de las características más importantes de esta molécula. La acción reguladora se da a tres niveles:

- Evitando la formación de la convertasa de C3.
- Disociando esta convertasa una vez que se ha ensamblado.
- Inactivando las formas activas de C3 mediante proteólisis por factor I (fI).



**Fig. 3. Estructura y cambios conformacionales de C3.** A) Esquema extendido de los diferentes dominios de C3 y localización en cada una de las cadenas de la molécula. B) Estructura tridimensional y esquemática de C3 y C3b donde se puede ver el cambio conformacional de la molécula de C3 al pasar a C3b que le permitirá unir fB y formar la convertasa de C3 de la AP.

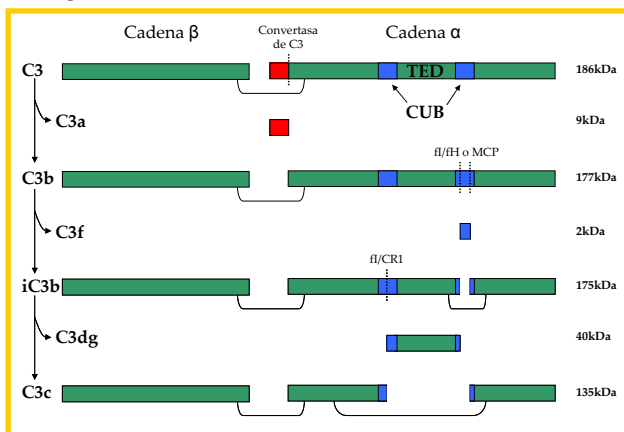
La inactivación de C3b ocurre por medio de una proteasa plasmática llamada fI, capaz de cortar la molécula de C3b en distintas regiones inactivándola (Fig. 4). fI requiere para su acción de la presencia de reguladores de la AP del complemento que actúan como cofactores. El primer paso de inactivación de C3b ocurre cuando se producen dos cortes en una de las cadenas del dominio CUB generándose la molécula inactiva de C3b llamada iC3b. En este proceso se libera un fragmento llamado C3f mientras que iC3b permanece unido a la superficie donde se encontraba unido el C3b. El siguiente paso de inactivación tiene lugar cuando fI escinde la cadena que permanece intacta en el CUB, liberándose de la superficie un fragmento proteico conocido como C3c. El dominio TED, que en este estado se denomina C3dg, permanece unido a la

superficie. El último paso de inactivación ocurre cuando la plasmina corta el C3dg en C3d y C3g.

### 3.2. Factor B

fB es el componente de la convertasa de C3 de la AP del complemento que posee la actividad serin-proteasa necesaria para escindir el fragmento C3a de las moléculas de C3 en la activación de la AP. La molécula de fB, antes de formar la convertasa, se encuentra en plasma en forma de proenzima con un tamaño de 90 kDa y compuesta por: una región con 3 dominios de repeticiones consenso cortas o SCR (Short Consensus Repeats) unidos por un conector al dominio VWA (Von Willebrand factor A) y, por último, el dominio C-terminal serin-proteasa, que es el que posee el sitio catalítico (Milder *et al.* 2007). fB se une a C3b por los dominios SCR (Ba) y de una

forma magnesio-dependiente por el VWA. Una vez unido, se produce un cambio conformacional que expone el conector que puede entonces ser escindido por fD. Esta proteólisis libera el fragmento Ba y deja el Bb unido a C3b formando el complejo C3bBb que es la convertasa de C3 de la AP del complemento. Esta es bastante inestable y una vez disociado el fragmento Bb no puede volver a formar convertasa (Pangburn *et al.* 1986).



**Fig. 4. Activación de C3 e inactivación de C3b.** Esta figura es una representación del corte que sufre la molécula de C3 durante su activación a C3b por la convertasa de C3 y los siguientes cortes que C3b sufre para ser inactivado por fI y sus cofactores.

### 3.3. Properdina

Properdina es el tercer activador de la AP del complemento y su función es unir la convertasa de C3 y estabilizarla. Es una proteína plasmática de un tamaño de 53 kDa y se encuentra en forma de monómeros, dímeros, trímeros y tetrámeros. Esta compuesta por 6 dominios trombospodina tipo 1 o TSR (Thrombospodin type 1) de los cuales el TSR4 y el TSR5 son los encargados de unir C3b y estabilizar la convertasa de C3 de la AP (Higgins *et al.* 1995; Perdikoulis *et al.* 2001), mientras que el TSR6 es el que interviene en la polimerización.

Recientemente se ha descrito una nueva forma de localizar la activación de la AP del complemento sobre superficies de patógenos. En ella, la properdina actúa como proteína de reconocimiento inicial del microorganismo y ahí es donde se une C3b y fB para formar la convertasa de C3 de la AP (Spitzer *et al.* 2007).

## 4. Regulación de la AP del complemento.

El mecanismo regulador del complemento actúa muy eficientemente permitiendo que su activación se focalice en las superficies activadoras evitando la deposición de sus componentes en células del propio organismo y, en consecuencia, el daño tisular. Para ello, hay proteínas reguladoras del complemento tanto en plasma como en superficies

celulares (**Fig. 5**):

Reguladores plasmáticos:

- Factor H (fH). Disocia las convertasas de C3 y C5 de la AP del complemento, actúa de cofactor para fI y compite con fB por la unión a C3b

- Proteína de unión a C4 o C4BP (C4 Binding Protein), es el principal regulador de la CP del complemento al disociar su convertasa y actuar como cofactor para la proteólisis de C4b por fI. Recientemente se ha descrito que puede actuar también como cofactor para fI en la proteólisis de C3b (Blom *et al.* 2003).

Reguladores de superficie:

- Proteína cofactora de membrana o MCP (Membrane Cofactor Protein) que actúa de cofactora para la proteólisis de C3b por fI.

- El factor acelerador del consumo o DAF (Decay Accelerating Factor) disocia la convertasa de C3 y C5.

- El receptor de complemento tipo 1 o CR1 (Complement Receptor type 1) disocia la convertasa de C3 y C5 y actúa como cofactor para fI.

- fH, pese a ser una proteína plasmática, es capaz de regular el complemento en superficies.

La regulación de la AP del complemento no se da solo a nivel de las convertasas y las moléculas activadas de C3. El MAC es susceptible de regulación por las proteínas clusterina, vitronectina y CD59 que evitan tanto la inserción inicial de C9 como su polimerización (Holers 2008). Además, las anafilotoxinas C3a, C4a y C5a se degradan rápidamente en plasma por las carboxipeptidasas N y R evitando una excesiva respuesta inmunitaria.

Todos las proteínas reguladoras de las convertasas de C3, tanto plasmáticas como de membrana, a excepción de fI, se encuentran codificadas muy cerca en el genoma, concretamente en la región 1q32 en el llamado cluster RCA (Regulator of Complement Activation) (Rodríguez de Córdoba *et al.* 1985; Rodríguez de Córdoba *et al.* 1999). Sus genes se encuentran dispuestos en tándem con la organización que se muestra en la **Fig. 6**. Las proteínas codificadas en este cluster están compuestas por un número variable de SCRs de unos 60 aminoácidos cada uno alineados en tándem (Ripoche *et al.* 1988). Los SCRs tienen muchos aminoácidos conservados en su secuencia y su estructura es globular con 6 láminas  $\beta$  en antiparalelo conectadas por cadenas sencillas (Barlow *et al.* 1992; Barlow *et al.* 1993). Esta similitud se debe principalmente a que estos genes se produjeron por duplicaciones segmentarias dando genes con un alto grado de homología y función relacionada.

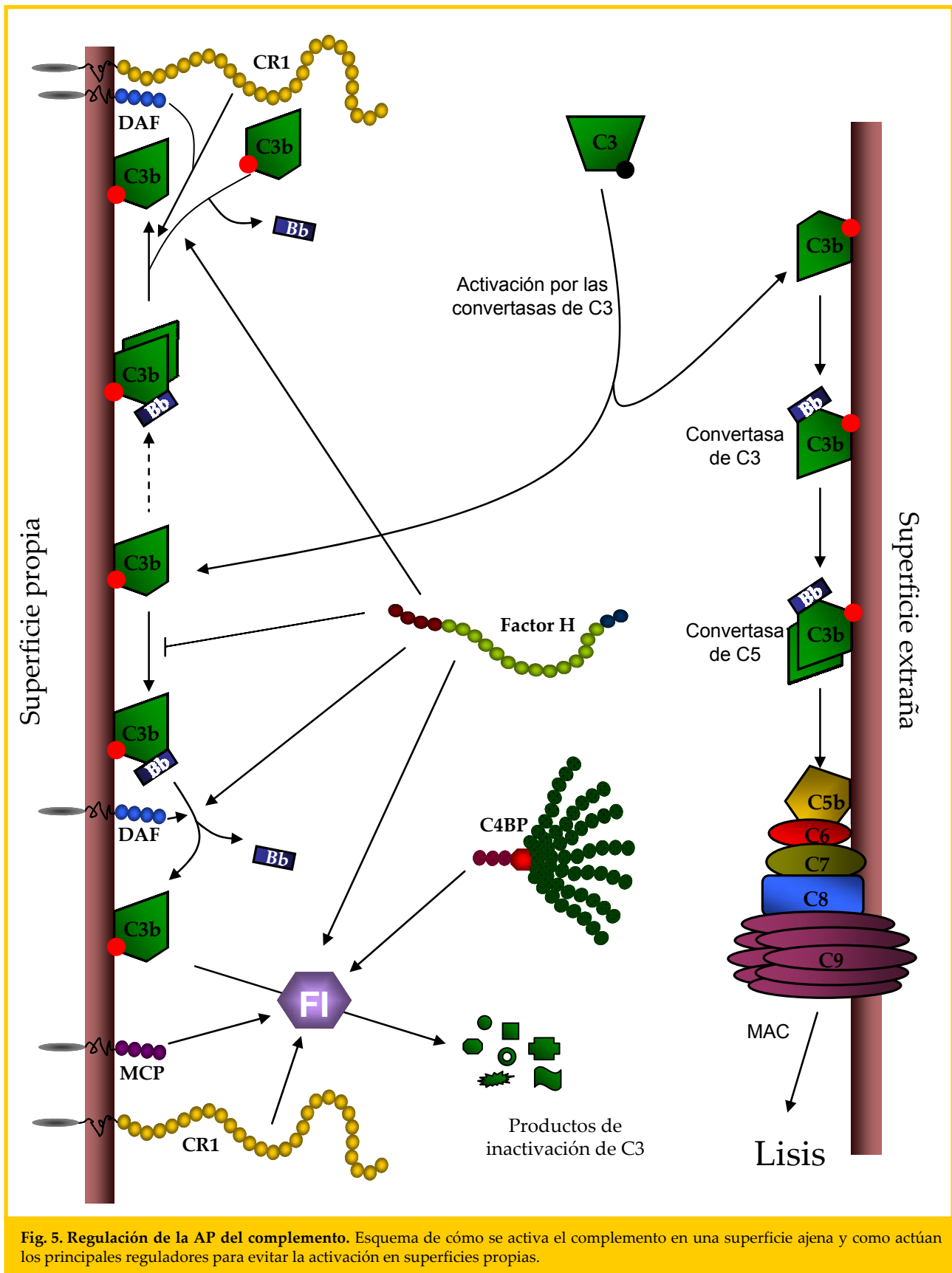
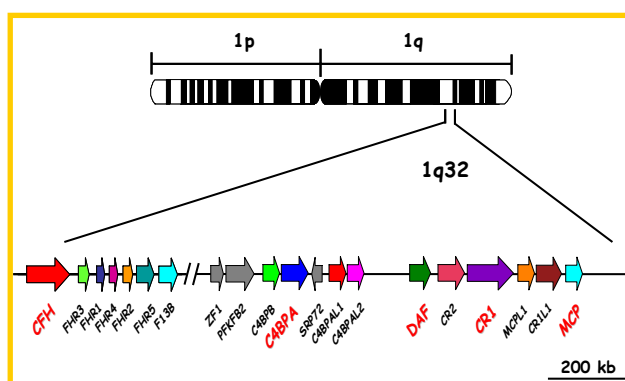


Fig. 5. Regulación de la AP del complemento. Esquema de cómo se activa el complemento en una superficie ajena y como actúan los principales reguladores para evitar la activación en superficies propias.





6. RCA. Es una representación esquemática del RCA donde se muestran todos los genes con sus orientaciones. Las flechas grises indican genes que no tienen nada que ver con el complemento y los genes nombrados en rojo son los de más eficacia reguladora.

#### 4.1. Factor H.

Es el principal regulador de la AP del complemento. fH es una glicoproteína plasmática de una sola cadena (155 kDa) que se sintetiza principalmente en el hígado y está compuesta por 20 dominios SCR (Fig. 5). La concentración de fH en plasma oscila entre 10 y 35 mg/dl y está influida por factores ambientales como es el tabaquismo (Esparza-Gordillo J *et al.* 2004). Su acción reguladora se produce a tres niveles:

- Disocia las convertasas de C3 y C5 de la AP.
- Compite por C3b con fB impidiendo la formación de la convertasa.
- Actúa como cofactor para fI en la proteólisis de C3b.

La acción reguladora de fH se encuentra en su región N-terminal capaz de realizar todas las funciones enumeradas con anterioridad (SCR1-4). Pese a ser una proteína plasmática, fH es capaz de regular el complemento en superficies gracias sobre todo a su región C-terminal cargada positivamente (SCRs 19-20) que es capaz de unirse a superficies ricas en ácidos siálico y polianiones como heparina (Rodríguez de Córdoba *et al.* 2004; Ferreira *et al.* 2006). Además, los SCR6-8 también unen polianiones y ácido siálico haciendo su unión a superficies propias más estable. Por otra parte, fH tiene tres regiones de interacción con C3b: SCR1-4, 6-8 y 19-20 las cuales le ayudan a desarrollar su función (Schmidt *et al.* 2008).

Como era de esperar, la regulación de fH sobre superficies depende de la composición de estas. Las membranas eucariotas son ricas en ácido siálico y polianiones de forma que fH se unirá a estas evitando la activación de la AP del complemento que conduciría a daño tisular. Por otra parte, las membranas de los microorganismos carecen de estos

componentes no habiendo nada que evite la activación del complemento sobre ellos.

fH tiene además otras funciones, entre las que destaca su papel en la apoptosis, proceso que realiza junto a la C4BP. Estas dos proteínas se unen a las células apoptóticas en fase avanzada, evitando el exceso de activación y la lisis de estas por el complemento y en consecuencia procesos de inflamación incontrolada (Trouw *et al.* 2007).

A nivel genético, el gen de fH (CFH) está compuesto de 23 exones, el primero codifica para la región 5' no traducida y el exón 10 es específico de FHL1 (FH Like 1) un producto alternativo de "splicing" de CFH (4.1.1). Los demás exones codifican cada uno para un SCR excepto el SCR2 que está codificado por los exones 3 y 4. CFH se encuentra localizado en la región centromérica del cluster RCA seguido de los genes fH relacionados o CFHR1-5 (CFH Related 1-5) muy homólogos a este (4.1.2) (Fig. 6 y 7).

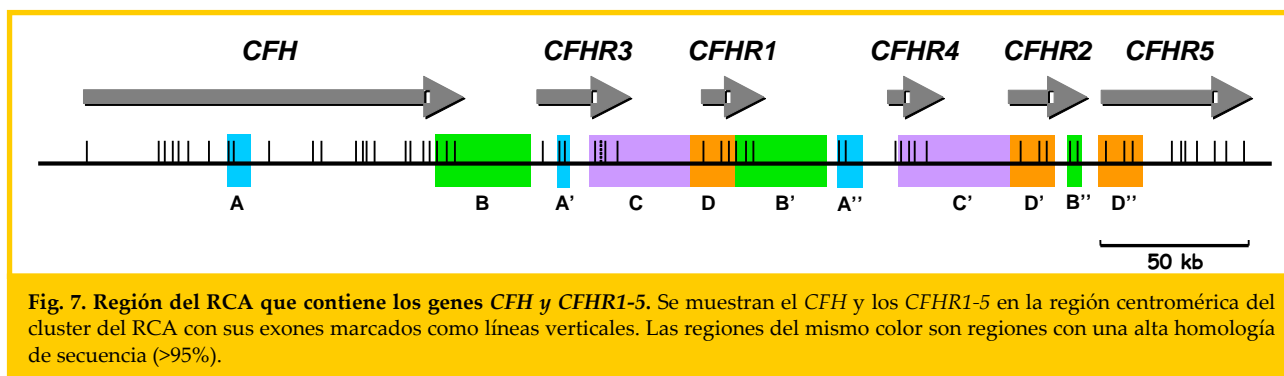
##### 4.1.1. FHL1.

Es el producto de procesamiento alternativo de 43 kDa (Misasi R *et al.* 1989) producido por los primeros 9 exones de CFH y el décimo, específico de FHL1, que le otorga una cola C-terminal de 4 aminoácidos (Schwaebler W *et al.* 1987; Estaller C *et al.* 1991). Como era de esperar FHL1 comparte unión a ligando y actividad reguladora en el N-terminal con fH (Kuhn *et al.* 1995), pero su capacidad de regular el complemento sobre superficies es menor que la de fH debido a que carece de la región C-terminal de este.

##### 4.1.2. FHR1-5.

Es un grupo de 5 proteínas plasmáticas sintetizadas en el hígado, muy relacionadas estructuralmente con fH aunque su concentración en plasma es muy inferior. Se encuentran codificadas en el RCA en posición 3' con respecto al gen de fH con el que guardan una homología de secuencia de hasta el 100% en algunas regiones (Fig. 7).

La función de estas proteínas no ha sido caracterizada completamente. Se ha descrito que FHR1 actúa a nivel de la regulación de la convertasa de C5 de la AP (Heinen *et al.* 2009) (Fig. 5), además de estar asociado con la respuesta de los neutrófilos con lipopolisacáridos junto con FHR2 (Park *et al.* 1996). La proteína FHR3 tiene capacidad reguladora ya que inhibe la actividad de la convertasa de la AP del complemento y evita la formación de C5a (Hellwage *et al.* 1999; Fritsche *et al.* 2010). FHR4 se encuentra en lipoproteínas ricas en triglicéridos, VLDLs y quilomicrones, suponiéndosele un papel en el metabolismo lipídico (Skerka *et al.* 1997).



**Fig. 7. Región del RCA que contiene los genes *CFH* y *CFHR1-5*.** Se muestran el *CFH* y los *CFHR1-5* en la región centromérica del cluster del RCA con sus exones marcados como líneas verticales. Las regiones del mismo color son regiones con una alta homología de secuencia (>95%).

Además, FHR4, une C3b (Zipfel *et al.* 1999). La última de estas proteínas, FHR5, se ha encontrado *in vivo* asociado con inmunocomplejos (McRae *et al.* 2001) y se ha descrito que tiene actividad cofactora aunque mucho más débil que la de fH (McRae *et al.* 2005).

#### 4.2. C4BP.

C4BP es el principal regulador de la CP del complemento. Es una proteína plasmática muy abundante que se sintetiza principalmente en el hígado y que presenta tres posibles isoformas ( $\alpha\beta1$ ,  $\alpha\beta0$  y  $\alpha\beta1$ ). La variante  $\alpha\beta1$  es la más abundante y está compuesta por 7 cadenas  $\alpha$  de 70 kDa cada una compuestas por 8 SCRs y una región de oligomerización, y una cadena  $\beta$  de 45 kDa con 3 SCRs, seguida de otra región de oligomerización. A través de estas regiones de oligomerización C-terminal se unen las distintas cadenas (Dahlbäck *et al.* 1983; Hillarp *et al.* 1988) (**Fig. 5**).

A pesar de que la principal función de esta proteína es la de regular la convertasa de C3 de la CP, se ha descrito que también puede actuar como cofactor para la inactivación proteolítica de C3b aunque con una eficacia muchísimo menor que fH (Blom *et al.* 2003). Esta proteína tiene un rol importante en apoptosis junto a fH como se ha comentado con anterioridad (Trouw *et al.* 2007).

#### 4.3. CR1.

Está presente en diferentes células plasmáticas y puede presentarse asociada a membrana o soluble (en menor medida). Consta de 30 SCRs, los primeros

28 agrupados en 4 repeticiones homólogas largas o LHR (Long Homologous Repeats), una región transmembrana y un tallo citoplasmático. Una de sus funciones es la disociación de las convertasas de C3 y C5 de las 3 vías de activación del complemento. Por otra parte, actúa como cofactor para la proteólisis de C3b/C4b por fI. Otras funciones de esta proteína son el aclaramiento de inmunocomplejos, receptores para fagocitos y en cierto modo, modula la respuesta de los linfocitos B y T (Khera *et al.* 2009) (**Fig. 5**).

#### 4.4. MCP.

Es una proteína de membrana cuya función es la de actuar como cofactor para la proteólisis de C3b/C4b por fI. Desde la región N-terminal consta de 4 dominios SCR extracelulares, una región enriquecida en serinas, treoninas y prolinas, otra región de función desconocida, un dominio hidrofóbico transmembrana, un anclaje citoplasmático y una cola citoplasmática (Liszewski *et al.* 1991). Esta proteína se expresa en todos los tejidos del organismo a excepción de los eritrocitos siendo más abundante en riñón.

#### 4.5. DAF

Al igual que MCP es una proteína de membrana con estructura similar excepto por su dominio transmembrana del tipo GPI (Glicosil Phosphatidylinositol). Su función es la de disociar la convertasa tanto de la AP como de la CP y su actividad se concentra sobre todo en los SCRs 2, 3 y 4 (Harris *et al.* 2007; Kuttner-Kondo *et al.* 2007).

## Asociación del complemento con patología.

Los defectos en la regulación y/o activación del complemento pueden conducir a la predisposición a infecciones por diversos patógenos así como a padecer enfermedades crónicas. Dentro de este segundo grupo se encuentran el síndrome hemolítico urémico atípico o aHUS (Atypical Haemolitic Uraemic Syndrom) y la enfermedad por depósitos densos o DDD (Dense Deposit Disease). Ambas son enfermedades renales de baja prevalencia pero muy graves llegando en muchos de los casos a enfermedad renal terminal. En esta tesis nos hemos centrado en entender los mecanismos moleculares que conducen a estas dos patologías.

### 1. aHUS

El síndrome hemolítico urémico (HUS; OMIM #235400) es una enfermedad renal descrita por primera vez por von Gasser (Gasser C *et al.* 1955) caracterizada principalmente por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y fallo renal agudo. Uno de sus marcadores principales es la presencia de esquistocitos, que son fragmentos de eritrocitos en la sangre circulante que se producen al romperse estos en su paso a gran velocidad por los capilares renales parcialmente ocluidos por microtrombos. En la forma clásica el HUS se produce por la infección alimentaria con la cepa de *Escherichia coli* O157:H7. Este patógeno se introduce en el organismo por ingesta, coloniza el intestino grueso adhiriéndose a las células endoteliales donde se divide e invade los tejidos subyacentes pudiendo producir diarreas sanguinolentas (Karmali 2004) y, a veces, vómitos y recuento leucocitario bajo (Noris *et al.* 2005). Una vez en el intestino grueso es donde produce y libera una verotoxina capaz de dañar endotelios de diversos órganos como el riñón. El HUS producido por estas infecciones se da principalmente en niños, siendo la principal causa de fallo renal en este grupo poblacional. Este fallo renal se recupera casi en la totalidad de los casos (Noris *et al.* 2005).

Dentro de los pacientes con HUS hay entre un 5 y un 10% que no se asocian con infección por *Escherichia coli* O157:H7, cursan sin diarrea y sufren de recurrencias continuas. A esta forma de HUS se le denomina forma atípica (aHUS) y se da tanto en niños como en adultos teniendo una mortalidad de alrededor del 30% en la fase aguda de la enfermedad y una tasa de enfermedad renal terminal del 50% (Kavanagh *et al.* 2008a). En esta patología el daño de las células endoteliales parece ser el primer paso en

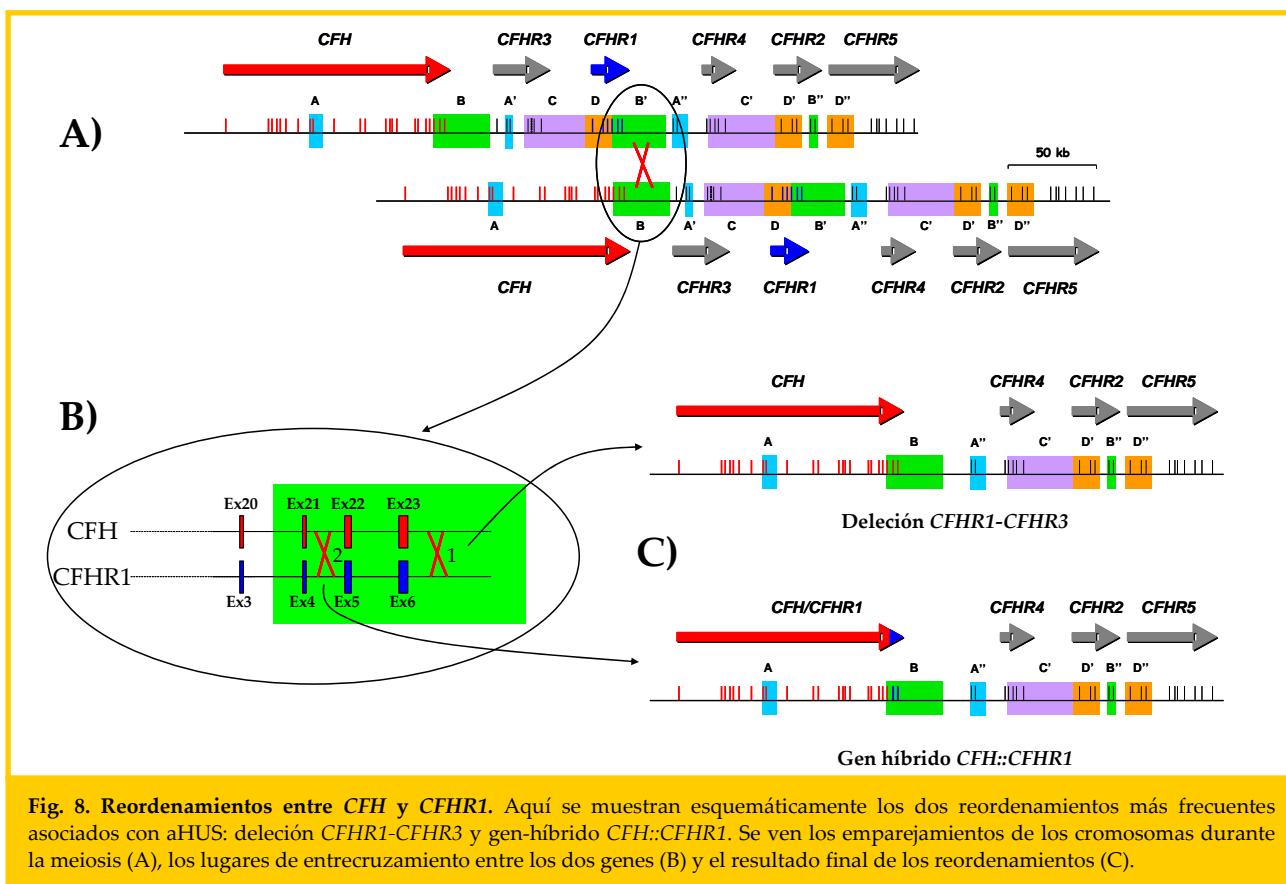
la evolución de la patología desencadenando una cascada de procesos que conducen a la formación de microtrombos hialinos de plaquetas y fibrina que ocluyen las arteriolas y capilares del glomérulo (Fig 9). Los desencadenantes de esta forma atípica de la enfermedad pueden ser: situaciones de postparto, transplantes, anticonceptivos orales, drogas antitumorales e inmunosupresivas.

Desde hace unos años se ha establecido una fuerte asociación entre la desregulación de la AP del complemento y aHUS, donde se han descrito numerosos factores de predisposición genética. Mediante estudios de desequilibrio de ligamiento se desveló asociación del cluster RCA con aHUS a partir de la cual se describieron las primeras mutaciones en *CFH* (Warwicker *et al.* 1998; Caprioli *et al.* 2001; Perez-Caballero *et al.* 2001; Richards *et al.* 2001; Caprioli *et al.* 2003; Manuelian *et al.* 2003; Rodríguez de Córdoba *et al.* 2008). La mayor parte de las mutaciones encontradas en *fH* se localizan en su región C-terminal impidiendo a *fH* regular el complemento sobre superficies celulares. Basándose en estas mutaciones, se desarrolló en nuestro laboratorio el primer modelo de ratón de aHUS en el que, a un ratón “Knock out” de *CFH*, se le introdujo un transgén de un *fH* sin los últimos 4 SCR que mimetizaba el efecto de las mutaciones en *fH* recién descritas (Pickering *et al.* 2007). Por otro lado, se ha descrito, que algunas mutaciones en *fH* conducen a la deposición de componentes del complemento sobre las plaquetas activándolas, pudiendo ser esta otra de las causas de la patología (Stahl *et al.* 2008).

También se han encontrado mutaciones en otros genes del complemento como en *MCP* (Richards *et al.* 2003; Esparza-Gordillo *et al.* 2005; Caprioli *et al.* 2006; Richards *et al.* 2007) y el gen de *fI* (*CFI*), la mayor parte de las cuales conducen a un defecto de expresión, y por tanto reducción de la capacidad reguladora (Fremaux-Bacchi *et al.* 2004; Esparza-Gordillo *et al.* 2005; Kavanagh *et al.* 2005; Caprioli *et al.* 2006; Nilsson *et al.* 2007).

En los últimos años se han encontrado mutaciones ganancia de función en varios activadores de la AP del complemento. El primer gen en el que se encontraron dichas mutaciones fue el de *fB* (*CFB*). Estas mutaciones producen un exceso de activación ya que el *fB* mutante o bien tienen más capacidad de formar convertasa o su convertasa de C3 es más resistente a la disociación por los reguladores (Goicoechea de Jorge *et al.* 2007). Más recientemente se han descrito las primeras mutaciones ganancia de función en C3. Las proteínas codificadas por estos genes mutantes tienen reducida su capacidad de ser regulados por MCP y en menor medida por *fH*, resultando esto en una ganancia de función (Fremaux-Bacchi *et al.* 2007; Tara *et al.* 2010).





**Fig. 8. Reordenamientos entre *CFH* y *CFHR1*.** Aquí se muestran esquemáticamente los dos reordenamientos más frecuentes asociados con aHUS: delección *CFHR1-CFHR3* y gen-híbrido *CFH::CFHR1*. Se ven los emparejamientos de los cromosomas durante la meiosis (A), los lugares de entrecruzamiento entre los dos genes (B) y el resultado final de los reordenamientos (C).

Además de las mutaciones mencionadas, se han descrito varios polimorfismos de riesgo asociados con aHUS como es el caso de un haplotipo de riesgo en MCP que se supone conduce a una menor expresión de esta proteína en las superficies celulares (Esparza-Gordillo *et al.* 2005). También se han descrito varios polimorfismos de riesgo en *CFH* (Caprioli *et al.* 2003) y en algunos de los *CFHR1-5* (Monteferrante *et al.* 2007).

Otro factor de predisposición para aHUS, es la presencia de auto-anticuerpos anti-fH que bloquean la parte C-terminal de este regulador impidiendo su acción en superficies, simulando el efecto de las mutaciones asociadas con aHUS en este regulador (Jozsi *et al.* 2007b; Skerka *et al.* 2009).

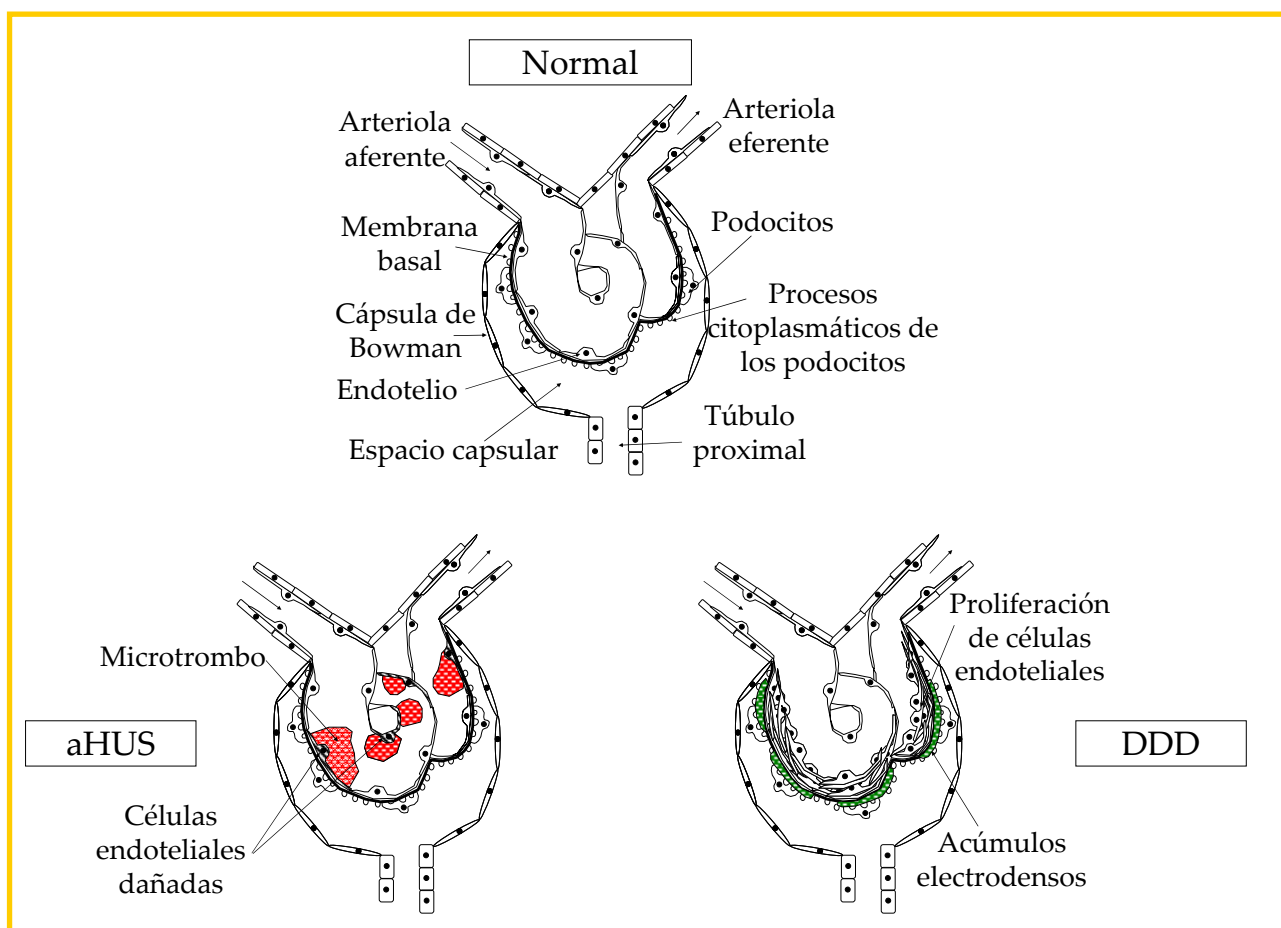
Muy recientemente, al estudio genético de aHUS se ha añadido una nueva variable que es la de los reordenamientos cromosómicos (Fig. 8). Como se ha comentado con anterioridad, el cluster del RCA consta de muchas duplicaciones segmentarias que facilitan los procesos de conversión génica (Perez-Caballero *et al.* 2001; Heinen *et al.* 2006) y recombinación no homóloga que pueden llevar a la delección o duplicación de genes. En los últimos años se han descrito algunos reordenamientos asociados con aHUS:

- La delección de los genes *CFHR1* y *CFHR3*, que es un polimorfismo común que en población caucásica se ha asociado con aHUS (Zipfel *et al.* 2007). Esta delección en homocigosis predispone para la

producción de los auto-anticuerpos anti-fH por un mecanismo que se desconoce (Jozsi *et al.* 2008) (Fig. 8B reordenamiento 1).

- Gen híbrido constituido por los 18 primeros SCRs de fH y los dos últimos de FHR1 que acarrea una delección *CFHR1-CFHR3* y produce una proteína incapaz de regular la activación del complemento en superficies celulares (Venables *et al.* 2006) (Fig. 8B reordenamiento 2).

Observando todos estos datos se puede deducir que es crítico para aHUS la combinación de un sistema del complemento activo junto con un defecto en la regulación sobre superficies. Cabe destacar que aHUS es una enfermedad compleja con una penetrancia incompleta de alrededor del 30% en pacientes con mutaciones en genes del complemento (Kavanagh *et al.* 2008a) en la que además, se observa una concurrencia de factores de riesgo dentro de las familias portadoras de estas (Esparza-Gordillo *et al.* 2005). Las mutaciones en aHUS rara vez producen hipocomplementemia (Perez-Caballero *et al.* 2001) y los pacientes con mutaciones en fH parecen tener una gravedad mayor que los que portan mutaciones en MCP (Caprioli *et al.* 2006). Por otra parte a pesar de que los números son pequeños, se ha descrito que pacientes portadores de mutaciones en fI y fB parecen estar asociados con peor prognosis ya que la mayoría conducen a enfermedad renal terminal (Caprioli *et al.* 2006).



**Fig. 9. El glomérulo renal sano y en patología.** Aquí podemos ver esquemáticamente un glomérulo renal normal en la parte superior, uno que sufre aHUS en la parte inferior izquierda con sus microtrombos y otro con DDD en la parte inferior derecha en el que se representan los acúmulos electrodensos en la membrana basal glomerular.

A día de hoy solo se conoce la causa de mas o menos la mitad de los pacientes con aHUS haciendo necesario el estudio de posibles nuevos factores de riesgo que puedan explicar el resto de los casos que hasta ahora permanecen sin resolver (Rodríguez de Córdoba *et al.* 2008).

## 2. DDD

La enfermedad por depósito denso (MPGN II; OMIM #609814) es un tipo de glomerulonefritis muy rara cuyas características clásicas son la presencia de acúmulos electrodensos en la membrana basal glomerular y la proliferación de las células endoteliales, lo que conlleva al engrosamiento de las paredes de los capilares periféricos en el glomérulo (Fig. 9). Los acúmulos electrodensos son de composición desconocida aunque se sabe que carecen de IgG descartando que esta patología se produzca por el depósito de inmunocomplejos en el glomérulo. El diagnóstico de estos pacientes se confirma por microscopía electrónica de biopsia. DDD afecta normalmente a niños entre 5 y 15 años. La remisión espontánea es rara y la mayoría de los afectados terminan con enfermedad renal terminal y, ocasionalmente, con degeneración retiniana debido a los depósitos que también se forman en el

ojo, similares a los característicos de la degeneración macular asociada a la edad o AMD (Age-related Macular Degeneration) (Appel *et al.* 2005) y que reciben el nombre de drusas.

Al igual que ocurría con aHUS, DDD se ha asociado con una disregulación de la AP del complemento. Esta disregulación conduce al consumo del C3 circulante en los pacientes y a acúmulos de productos de degradación de proteínas del complemento en el riñón. El C3 factor nefrítico (C3nef) esta fuertemente asociado con DDD y otras glomerulonefritis. C3nef es un anticuerpo contra la convertasa de C3 de la AP que la estabiliza, haciéndola mucho más resistente a la disociación, produciendo una activación descontrolada de la AP del complemento. La deficiencia de fH, normalmente debido a mutaciones, también está asociada con DDD. En los pacientes deficientes de fH la AP del complemento no puede ser regulada en fase fluida (Rodríguez de Córdoba *et al.* 2008). Recientemente, se ha descrito una mutación en la parte N-terminal de fH asociada con DDD y que impide que este regulador realice su función (Licht *et al.* 2006). Debido a que fH regula tanto en fase fluida como en superficies no esta aún claro si esta patología se debe exclusivamente a la activación del complemento en plasma o también a la falta de

control en superficies. Finalmente, se ha descrito la asociación de DDD con un polimorfismo situado en el gen *CFHR5* (Abrera-Abeleda *et al.* 2006). La proteína codificada por este gen se ha encontrado depositada en el glomérulo de pacientes con DDD (Murphy *et al.* 2002) sugiriendo que *FHR5* puede tener importancia en la patogénesis de esta afección renal.

Existen modelos animales en los que se ha observado un fenotipo similar a DDD. El cerdo deficiente de *fH* desarrolla una glomerulonefritis muy similar a la DDD humana que le lleva a fallo renal (Høgåsen *et al.* 1995). Lo mismo ocurre con el ratón “*knock out*” para *fH* (Pickering *et al.* 2002). Además de demostrar la activación incontrolada del complemento en fase fluida, los modelos animales nos han brindado más datos que no se podrían haber obtenido de los pacientes, como es el hecho de que para desarrollar DDD es necesario también de la

presencia de *fI*. En un ratón deficiente de *fH* y *fI* el *C3* se consume a *C3b* pero no se produce la patología, lo que sugiere que es necesario que los fragmentos de inactivación de *C3b*, *iC3b*, *C3c* y *C3dg* se produzcan para desarrollar DDD (Rose *et al.* 2008). De la misma forma estudios de trasplante en estos animales demuestran que el daño renal se produce por activación en fase fluida del complemento y que el MAC no está interviniendo en el desarrollo de la enfermedad (Pickering *et al.* 2006; Rose *et al.* 2008).

Más de la mitad de los pacientes con DDD no se explican con los genes de riesgo que se conocen actualmente haciendo necesario la búsqueda de nuevos genes candidatos para este grupo de pacientes con el fin de poder mejorar el conocimiento de esta patología y sus posibles tratamientos.

# Objetivos



Los objetivos planteados para esta tesis fueron los siguientes:

- 1. Búsqueda de nuevos genes candidatos dentro de los componentes del complemento que pudieran explicar los casos no resueltos de aHUS y DDD.**
- 2. Estudio de la correlación entre fenotipo clínico y genotipo en pacientes con aHUS.**
- 3. Caracterización funcional de mutaciones en C3 en aHUS y DDD.**



# Resultados

## Materiales y métodos



Los materiales y métodos y los resultados de esta tesis se encuentran descritos en los siguientes artículos y apartados.

1. **Martínez-Barricarte R**, Pianetti G, Gautard R, Misselwitz J, Strain L, Fremeaux-Bacchi V, Skerka C, Zipfel P, Goodship T, Noris M, Remuzzi G, Rodríguez de Córdoba S, on behalf of the European Working Party on the Genetics of, H. U. S. (2008). "The complement factor H R1210C mutation is associated with atypical hemolytic uremic syndrome". J Am Soc Nephrol. **19**(3):639-646.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18235085>

2. **Martínez-Barricarte R**, Goicoechea de Jorge E, Montes T, García-Layana A, Rodríguez de Córdoba S. (2009). "Lack of association between polymorphisms in C4b-binding protein and atypical haemolytic uraemic syndrome in the Spanish population". Clin Exp Immunol. **155**(1):59-64.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19076829>

3. Tortajada A, Montes T, **Martínez-Barricarte R**, Morgan BP, Harris CL, Rodríguez de Córdoba S. (2009). "The disease-protective complement factor H allotypic variant Ile62 shows increased binding affinity for C3b and enhanced cofactor activity". Hum Mol Genet. **18**(18):3452-3461.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19549636>

4. Abarrategui-Garrido C\*, **Martínez-Barricarte R**\*, Lopez-Trascasa M, Rodríguez de Córdoba S, Sánchez-Corral P. (2009). "Characterization of complement factor H-related (CFHR) proteins in plasma reveals novel genetic variations of CFHR1 associated with atypical hemolytic uremic syndrome". Blood. **114**(19):4261-4271. (\* autoría compartida).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19745068>

5. Gale DP, Goicoechea de Jorge E, Cook HT, **Martínez-Barricarte R**, Hadjisavvas A, McLean AG, Pusey CD, Pierides A, Kyriacou K, Athanasiou Y, Voskarides K, Deltas C, Palmer A, Frémeaux-Bacchi V, Rodríguez de Córdoba S, Maxwell PH, Pickering MC. (2010). "Identification of a mutation in complement factor H-related protein 5 in patients of Cypriot origin with glomerulonephritis". Lancet. **376**(9743):794-801.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20800271>

6. **Martínez-Barricarte R**\*, Heurich M\*, Valdés-Cañedo F, Vazquez-Martul E, Torreira E, Montes T, Tortajada A, Pinto S, López-Trascasa M, Morgan BP, Llorca O, Harris CL, Rodríguez de Córdoba S. (2010). "Human C3 mutation reveals a mechanism of dense deposit disease pathogenesis and provides insights into complement activation and regulation". J Clin Invest. **120**(10):3702-3712. (\* autoría compartida).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20852386>

7. Heurich M, **Martínez-Barricarte R**, Francis NJ, Roberts DL, Rodríguez de Córdoba S, Morgan BP, Harris CL. (2010). "Common polymorphisms in C3, factor B and factor H collaborate to determine systemic complement activity and disease risk". (Enviado a Nature Medicine).

8. Resultados adicionales.

## La mutación R1210C en Factor H del complemento está asociada con el síndrome hemolítico urémico atípico.

**R. Martínez-Barricarte**, G. Pianetti, R. Gautard, J. Misselwitz, L. Strain, V. Fremeaux-Bacchi, C. Skerka, P. F. Zipfel, T. Goodship, M. Noris, G. Remuzzi y S. Rodríguez de Córdoba en nombre del Grupo Europeo de Trabajo sobre la Genética del Síndrome Hemolítico Urémico Atípico.

Las mutaciones en el gen que codifica para fH que alteran su zona C-terminal encargada de la unión a polianiones y C3b, limita la capacidad de fH para proteger células del propio organismo. Estas mutaciones se encuentran fuertemente asociadas con aHUS. A pesar de que la mayoría de las mutaciones en *CFH* asociada con aHUS son “únicas” encontrándose solo en un paciente o familia, la mutación R1210C se ha descrito en varios pacientes no relacionados y de orígenes geográficos distintos. Hemos analizado 5 familias y 7 individuos para intentar caracterizar su origen y hallar una correlación entre la mutación R1210C y el fenotipo clínico. El fenotipo clínico de los pacientes con aHUS portadores de la mutación R1210C es heterogéneo. Remarcablemente, 12 de los 13 portadores enfermos

portaban por lo menos uno de los factores de riesgo adicionales conocido para aHUS. Los datos obtenidos se encuentran en acuerdo con el 30% de penetrancia incompleta de aHUS en portadores de la mutación R1210C, e indican que la presencia de otros factores de riesgo genéticos o ambientales contribuyen a la manifestación y severidad de aHUS en estos sujetos. Los análisis genotípicos de polimorfismos en *CFH* y *CHFR3* en 12 portadores no relacionados sugieren que la mutación R1210C tiene un origen común. Como conclusión, podemos decir que la mutación R1210C del factor H del complemento es una mutación prototípica de aHUS que esta presente como un polimorfismo raro en poblaciones humanas separadas geográficamente.

## Falta de asociación entre polimorfismos en la proteína de unión a C4 con síndrome hemolítico urémico atípico en población española.

R. Martínez-Barricarte, E. Goicoechea de Jorge, T. Montes, A. García-Layana y S. Rodríguez de Córdoba.

La desregulación de la AP del complemento, causada por mutaciones en los genes que codifican para fH, MCP, fl o fB, están asociadas con predisposición para aHUS. C4BP, uno de los reguladores principales de la CP del complemento, posee también la capacidad de regular la AP. Además, el polimorfismo en C4BP p.Arg240His se ha asociado recientemente con predisposición para aHUS ya que el alelo de riesgo 240His muestra una reducida capacidad de regular la AP. La identificación de nuevos factores de predisposición para aHUS tiene implicaciones muy importantes para el diagnóstico y tratamiento de un gran número de pacientes con aHUS; nosotros intentamos replicar este estudio de asociación en una cohorte independiente de pacientes con aHUS. En este estudio mostramos que el alelo 240His de

C4BP se corresponde con el alelo *C4BP\*2* identificado con anterioridad en heterocigotos por enfoque isoeléctrico en 1,9-3,7% de caucásicos no relacionados. Sin embargo, no hemos encontrado diferencias en la frecuencia de portadores del alelo 240His entre los 102 pacientes españoles con aHUS no relacionados y 128 controles españoles sanos de edad conocida. Esto no apoya la asociación entre p.Arg240His de *C4BP* y la predisposición a aHUS en población española. En un estudio similar, tampoco hemos encontrado asociación entre ninguno otro polimorfismos en *C4BP* y la predisposición para AMD, otra enfermedad fuertemente asociada con polimorfismos en factor H, y en la que se piensa que interviene una desregulación de la AP del complemento.

## La variante alotípica de factor H de protección para enfermedad Ile62 muestra una afinidad por C3b aumentada que favorece su actividad cofactora.

A. Tortajada, T. Montes, **R. Martínez-Barricarte**, B. P. Morgan, C. L. Harris, y S. Rodríguez de Córdoba.

Mutaciones y polimorfismos en el gen que codifica para factor H se han asociado con aHUS, DDD y AMD. Las variantes de predisposición dentro de *CFH* muestran una asociación diferencial entre estas patologías que ha sido muy útil para desentramar eventos críticos en la predisposición para una u otra. En contrate, el polimorfismo fH<sub>621</sub> confiere una alta protección para estas tres patologías. Usando métodos basados en ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) y resonancia de plasmón en superficie hemos demostrado que la variante fH<sub>621</sub> une más eficientemente C3b que fH<sub>62V</sub> y compite mejor por fB en la formación de la proconvertasa. Estudios funcionales demuestran un aumento en actividad cofactora de fH<sub>621</sub> en la proteólisis en fase fluida o

superficie de C3b por medio de fI; sin embargo, las dos variantes de fH no muestran diferencias en su capacidad de acelerar la disociación de la convertasa de C3 de la AP. A partir de estos datos, concluimos que la capacidad protectora de la variante fH<sub>621</sub> se debe a una mejor capacidad para unir C3b, inhibiendo la formación de la proconvertasa y catalizando la inactivación en fase fluida y en superficie de C3b. Esta demostración de las consecuencias del polimorfismo fH<sub>621</sub> nos ofrece un información adicional a cerca de la actividad reguladora de fH que será muy útil en la predicción de enfermedades y el futuro desarrollo de terapias efectivas para desórdenes causadas por desregulación del complemento.

## La caracterización de las proteínas factor H relacionadas en plasma revela nuevas variantes genéticas de *CFHR1* asociadas con el síndrome hemolítico urémico atípico.

C. Abarrategui-Garrido\*, R. Martínez-Barricarte\*, M. López-Trascasa, S. Rodríguez de Córdoba y P. Sánchez-Corral. \* Autoría compartida.

La familia de proteínas FHR1-5 es un grupo menor de proteínas plasmáticas que están genética y estructuralmente relacionadas con fH. En particular, la deficiencia de FHR1 y FHR3 se asocia con protección para AMD y con la presencia de auto-anticuerpos anti-fH en pacientes con aHUS. Nosotros hemos desarrollado una estrategia de proteómica para analizar las proteínas FHR1-5 en el plasma de controles, pacientes con aHUS y glomerulonefritis membranoproliferativa tipo 2 (MPGN2). En este trabajo describimos la identificación de personas portadoras de deficiencias no descritas con anterioridad en FHR1, FHR3 y FHR1/FHR4A resultado de mutaciones puntuales en *CFHR1*, *CFHR3* y de un reordenamiento que deletiona los genes *CFHR1* y *CFHR4*. Notablemente, pacientes con aHUS

deficientes de FHR1, pero no aquellos deficientes en FHR3, presentan auto-anticuerpos anti-fH sugiriendo que la producción de estos autoanticuerpos está únicamente relacionada con la deficiencia de FHR1. También describimos la caracterización de un nuevo polimorfismo en *CFHR1*, resultado de una conversión génica entre *CFH* y *CFHR1*, que se asocia fuertemente con aHUS. El alotipo de riesgo FHR1\*B, que tiene una gran similitud de secuencia con fH, podría competir con fH, disminuyendo la protección de las superficies celulares propias frente a daño por complemento. Como resumen, nuestro análisis de las proteínas FHR1-5 ha mejorado nuestro conocimiento de estas proteínas y ha ofrecido un nuevo punto de vista de la patogénesis de aHUS.

## Identificación de una mutación en FHR5 en pacientes de origen chipriota con glomerulonefritis.

D. P. Gale, E. Goicoechea de Jorge, H. T. Cook, **R. Martínez-Barricarte**, A. Hadjisavvas, A. G. McLean, C. D. Pusey, A. Pierides, K. Kyriacou, Y. Athanasiou, K. Voskarides, C. Deltas, A. Palmer, V. Frémeaux-Bacchi, S. Rodríguez de Córdoba, P. H. Maxwell y M. C. Pickering.

**Antecedentes.** El complemento es una parte clave del sistema inmunitario innato, además variaciones en los genes que regulan su activación se han asociado con enfermedad renal y otros tipos de patologías. Nosotros hemos intentado establecer las bases genéticas de una enfermedad familiar de desregulación del complemento asociada con hematuria microscópica persistente y macroscópica recurrente, glomerulonefritis y fallo renal progresivo.

**Métodos.** Hemos buscado pacientes del West London Renal and Transplant Centre (Londres, Reino Unido) con enfermedad renal inusual y familia con miembros enfermos como método para la identificación de nuevas causas genéticas de enfermedad renal. Se identificaron dos familias de origen chipriota en los que la transmisión de la enfermedad era consistente con una herencia autosómica dominante, y en los que la biopsia de al menos un individuo mostraba glomerulonefritis C3. Se identificó una mutación mediante un estudio de ligamiento en genoma completo a partir del cual se analizaron los genes candidatos. Se desarrolló una prueba diagnóstica basada en una reacción de PCR que se usó para buscar la mutación en muestras de

población control e individuos y familias con enfermedad renal.

**Descubrimientos.** En familias con enfermedad renal la patología cosegrega con una mutación en *CFHR5*. En una cohorte de 84 chipriotas con enfermedad renal inexplicada, 4 portaban dicha mutación. En total, hemos identificado 26 individuos con la mutación y evidencia de enfermedad renal en 11 niños no relacionados además de las dos familias originales. El FHR5 mutante está presente en plasma y tiene una afinidad reducida para componentes del complemento unidos a superficie. Hemos acuñado a esta enfermedad renal nefropatía CFHR5.

**Interpretación.** La nefropatía CFHR5 representa una parte substancial del porcentaje de los pacientes con enfermedad renal de origen chipriota y pueden ser diagnosticados con un test molecular específico. El alto riesgo de enfermedad renal progresiva en los portadores de mutaciones en *CFHR5* implica que la hematuria microscópica aislada o macroscópica recurrente no deben ser considerados como un hallazgo benigno en individuos de descendencia chipriota.

## Una Mutación en C3 humano revela mecanismos patogénicos de la enfermedad por depósito denso y ofrecen información adicional sobre la activación y regulación del complemento.

**R. Martínez-Barricarte\***, M. Heurich\*, F. Valdes-Cañedo, E. Vazquez-Martul, E. Torreira, T. Montes, A. Tortajada, S. Pinto, M. Lopez-Trascasa, B. P. Morgan, O. Llorca, C. L. Harris y S. Rodríguez de Córdoba. \* Autoría compartida.

La enfermedad por depósitos densos es una enfermedad renal muy severa, caracterizada por hiper celularidad mesangial y presencia de depósitos electrodensos en la membrana basal glomerular. Anteriormente, esta patología, se había asociado con deficiencias en fH, un regulador plasmático de la AP del complemento. Estudios animales han demostrado que la falta de fH produce un exceso de activación del complemento que consume por completo el factor 3 de complemento (C3) circulante produciendo DDD.

En nuestro estudio describimos una familia de DDD única, en la que la patología segrega con una delección de 2 aminoácidos en C3 (C3<sup>923ADG</sup>). Este C3 mutante es el predominante en el plasma de los pacientes debido a que no es activado a C3b por la convertasa de C3 de la vía alternativa del complemento. Sin embargo, cuando C3<sup>923ADG</sup> se activa espontáneamente, es capaz de formar una convertasa activa que consume el C3 salvaje. La convertasa mutante es eficazmente disociada por el

regulador de superficie DAF mientras que es resistente a la disociación por fH. Igualmente, las formas activas de C3<sup>923ADG</sup> son eficientemente inactivadas por proteólisis con fI con el regulador de membrana MCP como cofactor pero son resistentes a esta proteólisis en presencia de fH.

Nuestros resultados ponen al descubierto datos muy importantes con respecto a la patogénesis de DDD y la regulación del complemento. Primero de todo, demuestran que DDD en esta familia se da por una desregulación de la AP del complemento únicamente en fase fluida, que se ve continuamente activado consumiendo el C3 salvaje de los pacientes. Por otra parte, nos muestra que los reguladores de superficie (MCP y DAF) tienen distintos requerimientos estructurales para su acción con respecto a fH, haciendo este dato de especial interés para el posible desarrollo de fármacos. Por último, esta mutación profundiza en el conocimiento que se tiene de la activación de la vía alternativa del complemento.

## Polimorfismos comunes en C3, factor B y factor H colaboran para determinar la actividad del complemento y el riesgo a enfermedad.

M. Heurich, **R. Martínez-Barricarte**, N. J. Francis, D. L. Roberts, S. Rodríguez de Córdoba, B. P. Morgan y C. L. Harris.

Polimorfismos comunes en las proteínas de la vía alternativa del complemento C3 (C3<sub>R102G</sub>), factor B (fB<sub>R32Q</sub>) y factor H (fH<sub>V62I</sub>) están asociadas con AMD y otras patologías. Nuestros trabajos anteriores muestran que fB<sub>R32Q</sub> influye en la formación de la convertasa de C3 mientras que fH<sub>V62I</sub> afecta a su actividad cofactora por factor I. En este estudio mostramos como C3<sub>R102G</sub> (C3F/S) influencia la actividad de la AP. En ensayos hemolíticos, C3<sub>102G</sub> activa la AP más eficazmente (EC50 C3<sub>102G</sub>:157nM: C3<sub>102R</sub>:191nM: P<0,0001). La capacidad de disociación estaba inalterada, sin embargo, la capacidad cofactora de fH está reducida en

comparación con C3<sub>102G</sub>, favoreciendo la amplificación de la AP del complemento. La combinación las variantes de “riesgo” para AMD (C3<sub>102G</sub>, fB<sub>32R</sub>, fH<sub>62V</sub>) en ensayos hemolíticos muestra una actividad 6 veces mayor que cuando se realiza con la variantes de “protección” (C3<sub>102R</sub>, fB<sub>32Q</sub>, fH<sub>62I</sub>; P<0,0001). Estos datos introducen el concepto de un complotipo funcional (combinación de polimorfismos) que define la actividad del complemento en un individuo influenciando así su susceptibilidad frente a enfermedades desencadenadas por el complemento.





## Resultados adicionales

En este apartado comentaremos resultados y materiales y métodos que no han sido publicados pero son necesarios para complementar la discusión de los artículos que se acaban de mostrar.

### 1. Rs11120218 de *C4BPB*.

Este SNP (Single Nucleotide Polimorphism) lo hemos genotipado porque había sido descrito que reducía los niveles de expresión de *C4BPB* (Buil et al. 2010). Ya que la proteína codificada por este gen regula la AP del complemento (Blom et al. 2003), hemos planteado la hipótesis de que una bajada en sus niveles de expresión podría conducir a un complemento peor regulado aumentando el riesgo de padecer aHUS.

El genotipado lo hemos realizado por PCR cuantitativa por discriminación alélica con la sonda Taqman c\_31404253\_10 (Applied Biosystems) siguiendo las especificaciones del fabricante. Hemos genotipado 184 pacientes con aHUS de la cohorte española y 147 controles sanos. Con los datos de frecuencia alélicas hemos realizado un test exacto de Fisher y observado que no hay diferencia entre casos y controles ya que las frecuencias de los dos alelos en ambas poblaciones son idénticas (Tabla 1).

Frecuencia genotípica				
	aHUS	Frecuencia	Controles	Frecuencia
G/G	119	0,65	94	0,64
G/A	60	0,33	49	0,33
A/A	5	0,03	4	0,03
n	184		147	

Frecuencia alélicas				
	aHUS	Frecuencia	Controles	Frecuencia
G	298	0,81	237	0,81
A	70	0,19	57	0,19
n	368		294	

Tabla 1. Estudio casos controles para el polimorfismo rs11120218 de *C4BPB*. En esta tabla se observan los datos de genotipado con las frecuencias tanto alélicas como genotípicas y el valor p de el test exacto de Fisher.

### 2. Reordenamientos *CFH-CFHR1-5*.

Hemos buscado posibles nuevos reordenamientos en la región de *CFH* y los *CFHR1-5* en toda la cohorte española de aHUS y DDD que pudiesen estar asociados con estas afecciones renales. Esto lo hemos realizado mediante MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) con el kit ARMD mix1 (MRC-Holland). Los patrones anómalos de MLPA que hemos obtenido en los pacientes con aHUS los mostramos en la Fig. 10A.

Entre los pacientes de DDD hemos encontrado una familia (GN29) con una duplicación entre los exones 3 y 5 de *CFHR1* (Fig. 10B) que segrega con la patología. Esta duplicación da un FHR1 más largo que se expresa y secreta a plasma como se puede ver en el "western blot" realizado por la Dra. Sánchez-Corral en el Hospital Universitario La Paz (Fig. 11).

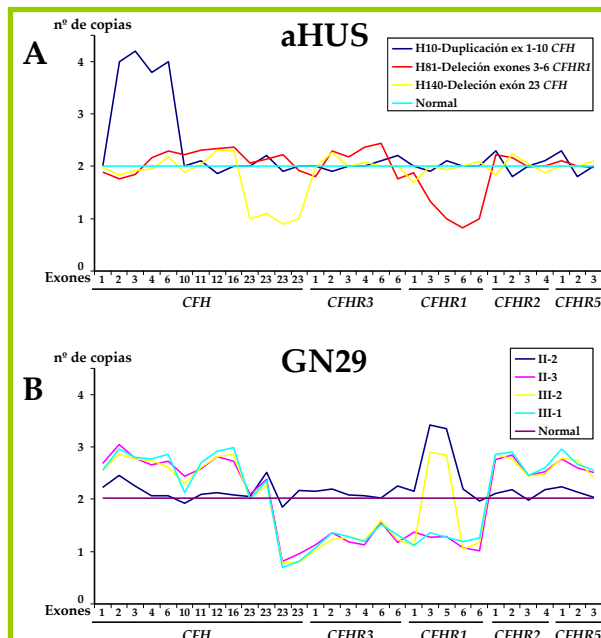


Fig. 10. Patrones anómalos de MLPA. En la parte superior se pueden ver las gráficas de los patrones anómalos de MLPA encontrados en nuestra cohorte de pacientes con aHUS. En el inferior se muestra el patrón del nuevo reordenamiento encontrado en la familia GN29 donde II-3, III-1 y III-2 portan además la delección *CFHR1-CFHR3*.

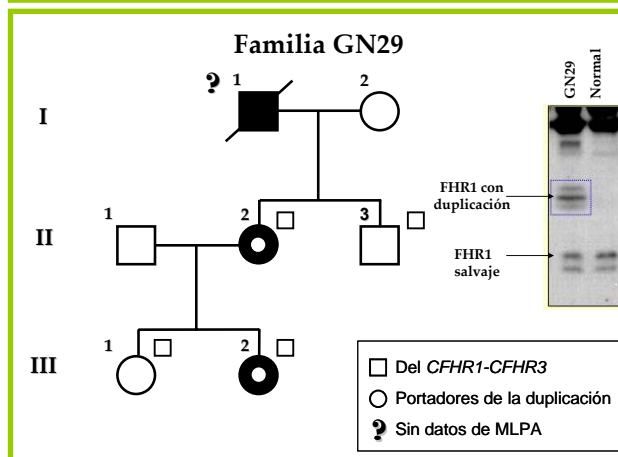


Fig. 11. Familia GN29. Árbol genealógico de la familia GN29 indicando los portadores de la duplicación. Se muestra también un "western blot" del caso índice (II-2) donde se recuadra la proteína mutante.

### 3. Mutación en properdina.

Ya que properdina es un activador de la AP del complemento secuenciamos su gen en busca de

Nombre	Secuencia	Tamaño en pares de bases	Gen	Región del Gen	Concentración por pareja en nM
X-BCAP31 BCAP31-Y	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAAACAGGAGCTGAAGGCTGACCT pCGAGAAGCTAAAGGACGAGCTGGACTTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	91	BCAP31	Exón 6	8
X-SS18 SS18-Y	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACAGCAGCCACTATGGGAATGATG pGGTCAAGTTAAACCAAGGCAATCATATGATGCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	96	SS18	Exón 6	0,5
X-SRY SRY-Y	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACAGCGAAGTGAAGTGGACAACAGGTTGTA pCAGGGATGACTGTACGAAAGCCACACACTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	100	SRY	Exón 1	1,5
X-PRex1 PRex1-Y	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACTCAGGGGTGTTAAGTGAATCAAGGTT pCACACGGCTAGGAAGTTGCTGCACGCTCTATTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	104	Properdina	Exón 1	2
X-PRex4 PRex4-Y	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACATCTTGTAGCTCATGCCAGGATGGGATGTGT pGTGCTCTTCTCCACAGGTCCTCCACGATGGTCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	108	Properdina	Exón 4	2
X-PRex7 PRex7-Y	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACAAGGGTCTAGGGGCTGAGAGGAAGGATTGAGGAGG pCCTTTCTCTCTACTCCCTTTCTCTCTCAACAGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	112	Properdina	Exón 7	1,5
X-PRex9 PRex9-Y	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACAAGACCTCCAGTCTGACTCTGTGACCCCTACCCCT pCATTGCAGTGAAAGGATCATGGTCAGAGTGGAGTACCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	116	Properdina	Exón 9	1,8
X-PRex10 PRex10-Y	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACAAGGGCAGAAAGCTGGTGGTGGAGGAAACGACCATGT pCTACACGCTGCTGCTTGCACAAAGACCCTGAGGAAGAGGCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC	118	Properdina	Exón 10	1,8

Tabla 3. Condiciones de MLPA para *properdina*. Las regiones azules en la secuencia indican la zona común de las sondas donde anillan los cebadores de la PCR. La región verde es la zona de hibridación con la secuencia diana. La “p” indica que la sonda está fosforilada en el extremo 5’.

posibles mutaciones ganancia de función en la cohorte española de pacientes con aHUS y DDD. Para ello utilizamos los siguientes cebadores:

Nombre	Secuencia	Tamaño del amplión en pares de bases	Oligo para secuenciar	Región
P-123F P-123R	TGCCACTTCCCTTCTCACT AACCTGAGGTATGGTCACG	1073	F-R	Exones 1,2 y3
P-456F P-456R	CTTACTCGGACCTGGTGTT AAGCAGACTGTCCCAAAATG	1526	F-R	Exones 4,5 y 6
P-789F P-789R	AAGGGTCTAGGGGCTGAGAG ACTCGGAAGGCAAGATACC	1075	F-R	Exones 7,8 y 9
P-10F P-10R	TTTTCAGATGAGGGAACCC GCCAGACAAGTAGCCAATC	901	F	Exón 10

Tabla 2. Cebadores y condiciones de amplificación para *properdina*.

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Polimerase Chain Reaction) la hemos llevado a cabo con el kit Certamp (Biotools) con un ciclo de desnaturalización de 30s a 95°C, otro de anillamiento a 65°C durante 45s y otro de elongación de 1 minuto con 30 segundos a 72°C para todos los amplicones, todo esto repetido 35 ciclos más un ciclo final de elongación de 10 minutos a 72°C.

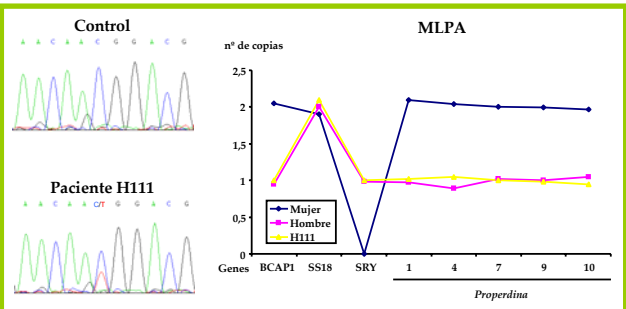


Fig. 12. Secuencia y MLPA de *properdina* en H111. A la izquierda se puede ver el cromatograma con la mutación encontrada en *properdina* mientras que a la derecha se ve el resultado de MLPA del paciente que porta la mutación junto con un control de género masculino y otro de género femenino.

Además, hemos desarrollado sondas de MLPA para contar el número de copias de este gen en el genoma de los pacientes. La reacción contiene sondas control en el gen *SS18* que no varía de número y en los cromosoma X (*BCAP31*) e Y (*SRY*)

como control de sexo, ya que *properdina* se encuentra en el cromosoma X.

Hemos encontrado una mutación en heterocigosis en el exón 7 de *properdina* en un paciente de género masculino (Fig. 12). Para comprobar que este paciente no tiene un cromosoma X de más o una duplicación del gen de *properdina* que pudiese explicar esta heterocigosis, hemos realizado la MLPA recién comentada. Hemos visto que nuestro paciente no tiene copias adicionales del cromosoma X ni del gen de *properdina* (Fig. 12).

#### 4. Mutaciones en C3.

Otro gen que hemos secuenciado ha sido el de C3 en toda nuestra cohorte de pacientes con aHUS la cual, en su mayor parte, esta compuesta por españoles teniendo algunos pacientes procedentes de otros países de Europa, Estados Unidos de America, Sudamérica y Túnez. Hemos encontrado 4 mutaciones en 4 individuos diferentes y en dos de los cuales había historia familiar de aHUS (Fig. 13). Ninguno de estos pacientes portaba mutaciones adicionales en *CFB*, *MCP*, *CFI*, *CFH* o *CFHR1-5*.

- Familia HUS19: Es una familia española con tres afectos todos ellos vivos (HUS19 o II-1, I1 y I-2). HUS19 es una niña de 7 años de edad que presento su primer episodio de aHUS con 14 meses después de una infección respiratoria. Desde entonces ha tenido 8 recurrencias todas ellas tratadas con diálisis peritoneal, transferencia e infusión de plasma, tras las cuales ha recuperado función renal. En la familia se observa que la madre (I-1) y una tía materna (I-2) también sufrieron un episodio de aHUS del que se recuperaron totalmente y del que no han tenido recurrencias. La madre sufrió su episodio cuando tenía 6 años y la tía materna desarrollo la patología a los 14 meses. Ambas recuperaron por completo su función renal aunque I-2 sufre de algunas secuelas neurológicas.

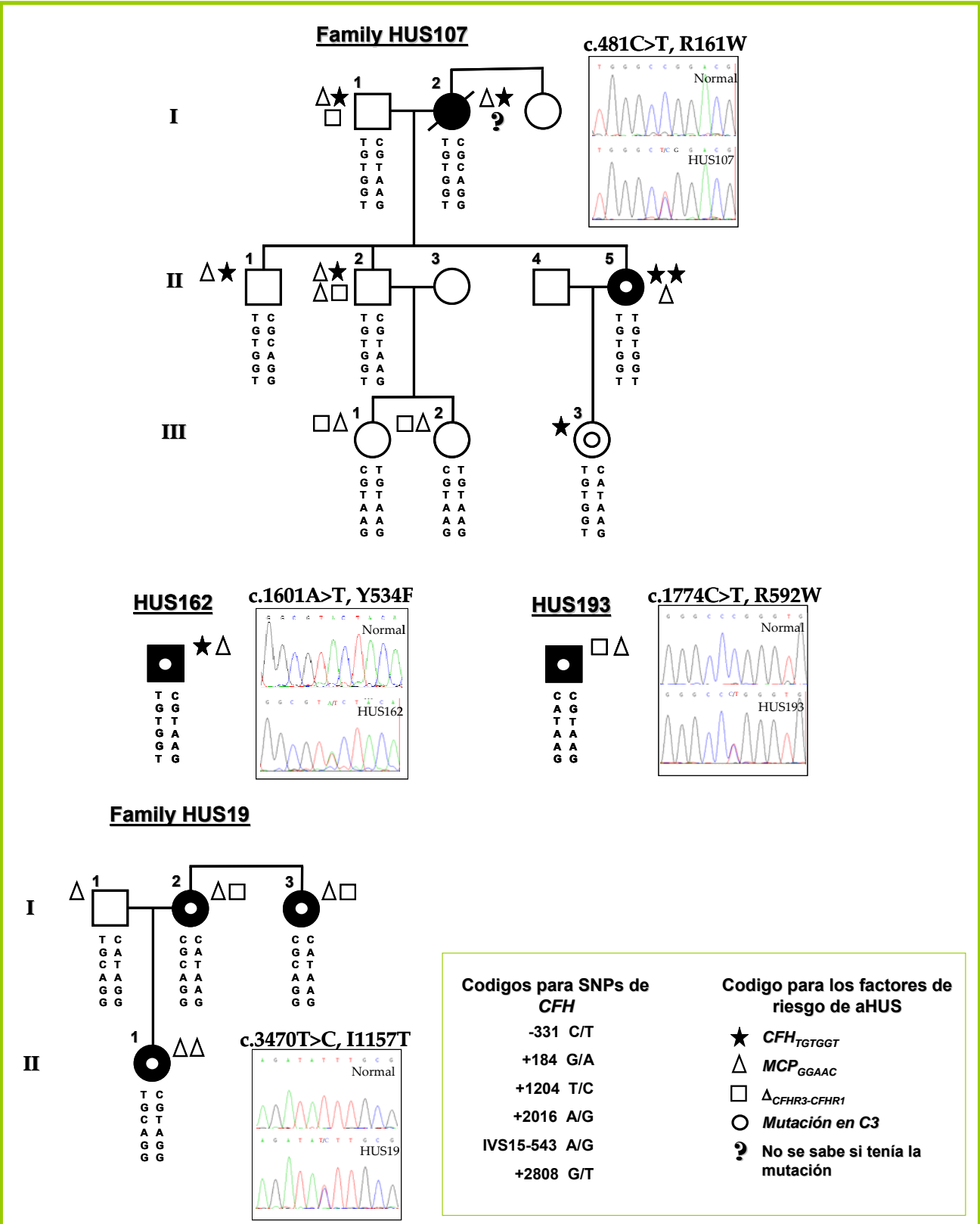
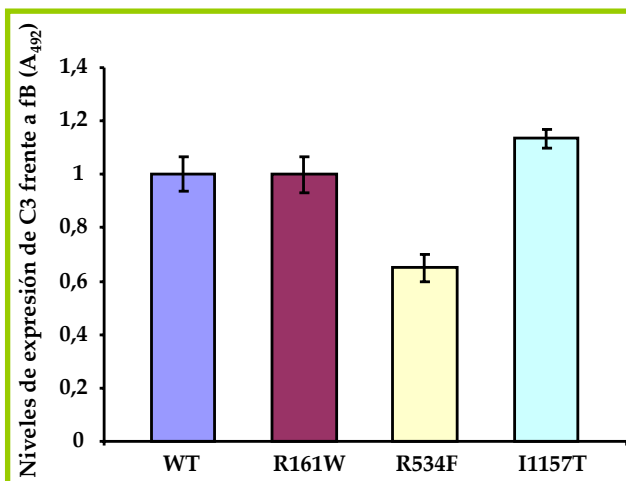


Fig. 13. Familia y cromatogramas de los pacientes con aHUS con mutaciones en C3. Aquí se muestran los árboles genealógicos de los pacientes portadores de mutaciones en C3 con sus cromatogramas correspondientes. Se indican debajo de cada individuo el haplotipo de factor H que portan y los símbolos adicionales corresponden con factores de riesgo extra explicados en la leyenda.

- Familia HUS107: HUS107 es una mujer perteneciente a otra familia española. El primer individuo en sufrir la patología en esta familia fue la madre del caso índice (I-2). HUS107 tiene una hija y dos hermanos sanos. Ella desarrollo la enfermedad a los 35 años asociado con el consumo de anticonceptivos orales. Este episodio cursó con desordenes neurológicos y fue tratado con antibióticos, inmunosupresores (vincristin), transferencia e intercambio de plasma. Actualmente sufre de insuficiencia renal crónica y está siendo tratada con diálisis. Su madre desarrollo la enfermedad a los 23 años de edad asociada con desordenes neurológicos. Recibió un riñón de un donante cadáver a los 28 años y murió a los 31 sin evidencia de recurrencia en el riñón transplantado.

- Paciente HUS162: Es un paciente originario de Túnez que sufrió un único episodio de aHUS sin recurrencias a los 43 años. No disponemos de historia familiar de este paciente. HUS162 es el único que presento niveles bajos de C3 y C4.

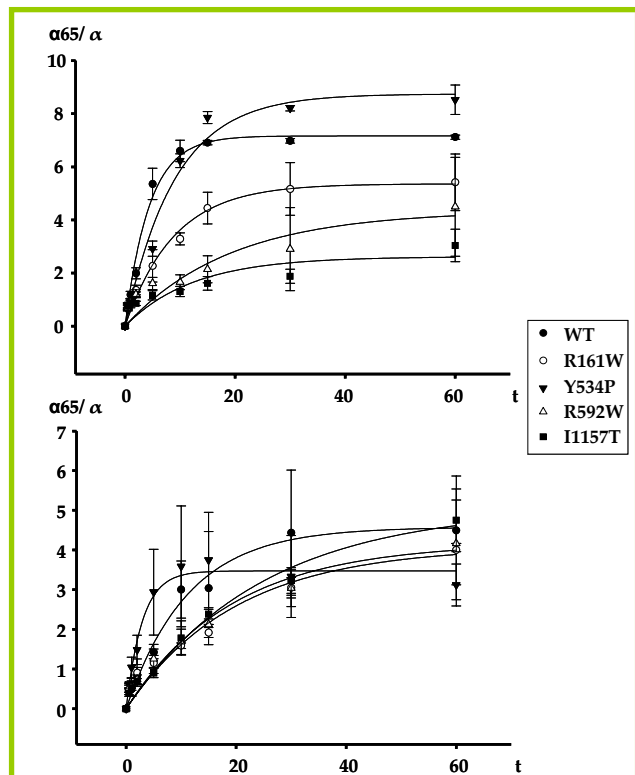
- Paciente HUS193: Este paciente sufrió un episodio de aHUS de origen desconocido del que se recupero por completo tras 8 meses en hemodiálisis. Sin embargo, 16 años después desarrollo enfermedad renal terminal. Actualmente está en hemodiálisis esperando para ser transplantado. Este paciente muestra hipocomplementemia permanente con niveles bajos de C3 y CH50 pero niveles normales de C4.



**Fig. 14. Ensayo de expresión de los mutantes de C3.** En esta gráfica vemos el nivel de expresión en células eucariotas de los distintos mutantes en C3 normalizados frente a la expresión de fB, con sus correspondientes desviaciones estándar.

Tras encontrar las mutaciones, hemos realizado ensayos de expresión en los que hemos transfectado células CHO con plásmidos que contienen C3 con las diferentes mutaciones y un plásmido con factor B como control de transfección como se ha descrito con anterioridad (Martínez-Barricarte *et al.* 2010).

Obtuvimos que todos se expresan aunque Y534P en menor nivel que el resto (Fig. 14). En la mutación R592W no hemos realizado este ensayo ya que se había descrito que su expresión ocurría en niveles normales (Fremaux-Bacchi *et al.* 2007).



**Fig. 15. Actividad cofactora de las mutaciones en C3 asociadas con aHUS.** Aquí se muestran los ensayos de actividad cofactora de los C3b de los mutantes con sMCP y factor H. En X se representa el tiempo y en Y el cociente del valor de densitometrado de las cadenas α65/α

Viendo que todas las proteínas mutantes se expresaban *in vitro*, hemos purificado los C3 directamente del plasma de los pacientes para hacer ensayos funcionales. El primer ensayo que hemos realizado ha sido el de afinidad por sMCP mediante resonancia de plasmón en superficie o SRP (Surface Plasmon Resonance) para el que me he desplazado al laboratorio de la Dra. Harris y el Dr. Morgan en Cardiff (Gales). Hemos tapizado la superficie de un chip de Biacore (GE Healthcare) con las mismas cantidades de iC3 de R161W, R592W e I1157T y un C3 salvaje para, a continuación, pasar sobre los C3s diferentes concentraciones de sMCP para comprobar la afinidad entre estas dos proteínas, como ya se ha descrito con anterioridad (Martínez-Barricarte *et al.* 2010). Hemos observado que las constantes de afinidad no variaban entre C3 salvaje y los mutantes. Sin embargo, hemos visto que el sMCP parece unirse como si hubiese solo la mitad de C3 en los chips tapizados con los C3 mutantes de lo que realmente hay. Debido a que los pacientes tienen las mutaciones en heterocigosis el C3 purificado de su plasma es una mezcla de salvaje y mutante. Esto nos

ha ayudado a interpretar los resultados de SRP: el sMCP se une solo a la mitad de la proteína unida al chip que hemos supuesto, es la proteína salvaje de tal forma que la constante de afinidad no varía, sugiriendo una afinidad mínima de los C3 mutantes por sMCP.

Para confirmar los datos de SPR hemos realizado ensayos de actividad cofactora en fase fluida. Hemos producido C3b de todos los mutantes y mezclado los C3bs con fH/fl o sMCP/fl, incubándolos a 37°C y sacando alícuotas a tiempos crecientes obteniendo las gráficas mostradas en la **Fig. 15** (Martínez-Barricarte *et al.* 2010).

Hemos observado una reducción en la capacidad cofactora sobre fl del sMCP mientras que la capacidad cofactora de fH permanecía inalterada. También hemos observado que la mutación del paciente tunecino, Y534P no muestra diferencia en ninguno de los dos ensayos en fase fluida con respecto al C3 salvaje.

## 5. Secuenciación del exón 6 de DAF.

Finalmente, hemos secuenciado el exón 6 del gen de DAF (SCR4) en nuestra cohorte de pacientes con aHUS. DAF es un posible gen candidato ya que defectos en su función podrían producir fallos en la regulación del complemento en superficies celulares compatibles con aHUS. Nos centramos en este SCR4 porque es de los mas importantes para su función (Harris *et al.* 2005).

Hemos utilizando los cebadores 5'-3':

- Sentido: CTTGTTGGTAATGCTGAATTTAG

- Antisentido: AATGTCTGCAACCCACATATAG

Hemos amplificado este exón mediante una PCR de 35 ciclos con un paso de desnaturalización de 30 segundos a 94°C, un paso de anillamiento de un minuto a 62°C y otro de elongación de 30 segundos a 72°C, todo ello seguido de un último paso de 10 minutos a 72°C. Con esto hemos amplificado un fragmente de 395 pares de bases que hemos mandado a secuenciar con el cebador sentido.



# Discusión



## Búsqueda de nuevos genes candidatos.

*Al comienzo de esta tesis se conocía el defecto genético subyacente de alrededor de la mitad de casos de aHUS y DDD. Con intención de intentar identificar el defecto genético que pudiese explicar la causa de la otra mitad de los casos, hemos secuenciado diversos genes del complemento en busca de mutaciones, hemos genotipado polimorfismos que pudiesen conllevar riesgo para patología y hemos buscado reordenamientos cromosómicos que acarreasen deleciones o duplicaciones de genes dentro del cluster del RCA que pudiesen estar asociados con aHUS y DDD. Tras estos estudios hemos encontrado mutaciones asociadas con estas patologías renales entre los genes CFHR1, CFHR3, C3 y properdina. Así mismo, hemos encontrado polimorfismos de riesgo para aHUS en CFHR1 y hemos asociado la falta de la proteína codificada por este gen con la producción de anticuerpos anti-fH que se asocian con aHUS. Igualmente, hemos descrito diversos nuevos reordenamientos en los genes CFH-CFHR1-5 asociados con patología renal. Por el contrario no hemos encontrado ninguna mutación en el exón 6 del gen de DAF y los polimorfismos rs11120218 del promotor de C4BPB y rs45574833 (c.719A>G, R240H) del exón 7 de C4BPA no mostraron ninguna asociación con aHUS.*

aHUS se relacionó con el sistema del complemento hace 12 años gracias a un estudio de desequilibrio de ligamiento en familias con esta patología se asoció con el cluster del RCA. El análisis más en detalle de los genes de este cluster condujo a la detección de las primeras mutaciones en el gen CFH en las familias originales y en individuos de cohortes de pacientes de otros países (Warwicker *et al.* 1998; Caprioli *et al.* 2001; Perez-Caballero *et al.* 2001; Richards *et al.* 2001; Manuelian *et al.* 2003; Rodríguez de Córdoba *et al.* 2008). Desde entonces se han identificado mutaciones en varios genes de este sistema de defensa. En los reguladores CFI (Fremaux-Bacchi *et al.* 2004; Kavanagh *et al.* 2008) y MCP (Richards *et al.* 2003; Esparza-Gordillo *et al.* 2005) se han descubierto tanto mutaciones como polimorfismos que afectan negativamente a la función o a sus niveles de expresión, predisponiendo para aHUS. Por otra parte, trabajos anteriores en el laboratorio, describieron la presencia de mutaciones ganancia de función en fB, uno de los principales activadores de la vía alternativa del complemento (Goicoechea de Jorge *et al.* 2007). Del mismo modo, recientemente se han descrito este tipo de mutaciones en el gen de C3 (Fremaux-

Bacchi *et al.* 2007). Sin embargo, a pesar de todos los avances en el conocimiento del aHUS en los últimos años, en el 50% de los casos se desconoce el defecto genético subyacente a esta patología. La situación es idéntica en DDD, enfermedad que también ha sido asociada con deficiencias y mutaciones en factor H y con el C3nef y donde, en la mayoría de los casos no se conoce el defecto genético subyacente. Estas incógnitas hacían necesaria la búsqueda de nuevos genes de riesgo que pudiesen explicar los casos sin resolver.

### 1. Reguladores del complemento.

Dado que la mayor parte de las variantes genéticas de riesgo para estas patologías impiden la correcta regulación del sistema del complemento, hemos buscado posibles genes candidatos en la región 1q32 donde se encuentra localizado el cluster del RCA que contiene todos los genes de los reguladores del sistema del complemento a excepción de CFI. Hemos comenzado el estudio por los genes CFHR1-5 que se encuentran codificados próximos a CFH en este cluster.

#### 1.1. Región CFH-CFHR1-5

Desde hace tiempo, los genes CFHR1-5 han llamado la atención de los investigadores ya que se han asociado con diversas patologías, pese a que su función no está bien caracterizada (Abredera-Abeleda *et al.* 2006; Hughes *et al.* 2006; Zipfel *et al.* 2007). Estos 5 genes se generaron por duplicaciones segmentarias a partir del CFH siendo esta la razón por la que tienen una alta homología entre ellos y con CFH que favorece, la aparición de procesos de recombinación no homóloga que conducen a la deleción o duplicación de genes (Fig. 8).

##### 1.1.1. Nuevos reordenamientos.

En esta parte de la investigación, hemos buscando nuevos reordenamientos en la región del RCA que contiene los genes CFH y CFHR1-5 que pudiesen estar asociados con aHUS o DDD, en las cohortes españolas de pacientes. Hemos encontrado dos pacientes con aHUS portadores del gen híbrido entre CFH y CFHR1 en el cual, la parte final de fH se encuentra sustituida por la parte final de FHR1, comprometiendo la función de fH como regulador en superficies celulares (Venables *et al.* 2006) (Fig. 8). Además, hemos descubierto nuevos reordenamientos dentro de esta región del RCA no descritos con anterioridad (Fig. 10):

- Una duplicación de los primeros 10 exones de fH, que teóricamente conduciría a una proteína de mayor tamaño con sus primeros 7 SCR duplicados. No hemos podido detectar esta proteína en plasma

por “western blot” sugiriendo que no se expresa o si lo hace no se secreta a plasma.

- Hemos descrito también una delección de la parte C-terminal de *CFH* que probablemente simula las mutaciones pérdida de función encontradas en esta región del gen en pacientes de aHUS.

- Una delección de la parte C-terminal de *CFHR1* y N-terminal del gen siguiente en el RCA, *CFHR2*, cuyo posible defecto funcional no lo hemos podido estudiar en detalle.

- Finalmente, hemos descubierto una duplicación entre los exones 3 y 5 de *CFHR1* en una familia con DDD en la que esta mutación segrega con la patología (Fig. 11 y 12).

Dado que ninguno de estos reordenamientos se han encontrado en nuestra cohorte de alrededor de 300 controles sanos, se podría decir que se asocian con aHUS o DDD a pesar de que el mecanismo patogénico aún esta por dilucidar.

### 1.1.2. Auto-anticuerpos anti-fH.

La delección *CFHR1-CFHR3* es un polimorfismo muy común en población de origen caucásico donde su frecuencia alélica es alrededor del 25% (Fig. 8) (Rodríguez de Córdoba *et al.* 2008). El grupo de Jena (Alemania) la había asociado con aHUS (Zipfel *et al.* 2007). Sin embargo, al analizar la población española no hemos observado que su frecuencia alélica esté aumentada en nuestra cohorte de pacientes.

Nosotros, hemos observado que la frecuencia genotípica en nuestra cohorte de pacientes con aHUS está fuera de equilibrio Hardy-Weinberg debido a un exceso de homocigotos. Este exceso podría deberse a su asociación con la producción de anticuerpos anti-fH asociados con aHUS (Jozsi *et al.* 2007a). Los auto-anticuerpos se habían asociado con la delección *CFHR1-CFHR3* en homocigosis. Sin embargo, nuestros datos parecen indicar que no es la delección de estos dos genes la que predispone a la producción de los anticuerpos, sino la falta de FHR1 circulante. Dos pacientes de nuestra cohorte, portadores de anticuerpos anti-fH y sin FHR1 pero con FHR3 circulante dan más fuerza a esta hipótesis:

- El primero con un nuevo reordenamiento en homocigosis que deleciona los genes *CFHR1* y *CFHR4*.

- El segundo, portador de una sola copia de *CFHR1* en el que hay una mutación que evita su expresión.

Por otro lado, hemos encontrado dos pacientes sin auto-anticuerpos anti-fH con FHR1 circulante pero sin FHR3. Estos datos confirman un papel más importante de FHR1 en su producción.

La forma en la que los auto-anticuerpos anti-fH se producen es desconocida. Podría suceder que durante el proceso de tolerización de las células B durante el desarrollo del sistema inmunitario, los individuos deficientes en FHR1 tengan tendencia a no destruir los clones de células B productoras de auto-anticuerpos anti-fH. Esta hipótesis se ve favorecida por el hecho de que los auto-anticuerpos producidos en este contexto, van dirigidos específicamente contra la región C-terminal de fH que tiene, en algunas zonas, una homología con FHR1 del 100% (Jozsi *et al.* 2007a; Jozsi *et al.* 2007b). Esto sugiere que FHR1 es la encargada de tolerizar esta región común de las dos proteínas.

Sin embargo, no todos los pacientes con auto-anticuerpos carecen de FHR1 circulante. En nuestra cohorte de pacientes hemos encontrado 7 individuos con auto-anticuerpos, de los cuales, 3 tienen la delección *CFHR1-CFHR3* en homocigosis, uno es heterocigoto para esta delección, otro es normal y los otros dos son los dos casos explicados con anterioridad en este apartado. La Dra. Sánchez-Corral en el Hospital Universitario La Paz, ha estudiado los anticuerpos del individuo heterocigoto para la delección *CFHR1-CFHR3* (H151) y ha observado que reaccionan exclusivamente con fH mientras que los de los pacientes sin FHR1 circulante lo hacen también contra esta proteína (Abarrategui-Garrido, manuscrito en preparación). Todo esto indica que hay varios tipos de auto-anticuerpos anti-fH dirigidos contra distintas partes de la molécula según el contexto en el que se producen además, muestran que las zonas de fH donde se encuentran los epítopos de los auto-anticuerpos son críticas para el desarrollo de aHUS.

### 1.1.3. FHR1.

En colaboración con el laboratorio de la Dra. Sánchez-Corral, hemos estudiado el FHR1 en el plasma de controles mediante “western blot” bidimensional. Hemos observado que FHR1 se comporta como una proteína bialélica con dos alelos de distinta acidez. Para identificar los cambios genéticos que producen cada alelo hemos secuenciado *CFHR1* en individuos homocigotos para ambas variantes. fH y FHR1 son muy homólogos en sus tres últimos SCRs de sus regiones C-terminal, sin embargo, hemos visto que el alelo más básico de FHR1 tiene una homología mayor con fH que el más ácido.

Sabiendo que *CFHR1* se comporta como un gen bialélico, hemos realizado un estudio casos-contróles en nuestra cohorte de pacientes con aHUS donde hemos observado una asociación significativa del alelo básico con la patología. Aunque los estudios funcionales para aclarar cual es el posible mecanismo patogénico se están llevando a cabo en

estos momentos, la posible explicación es que el alelo básico de FHR1 compite más que el alelo ácido con fH por los sitios de reconocimiento en C3b y las superficies celulares propias, haciendo a este regulador menos efectivo en su función y así pues, predisponiendo para esta enfermedad de daño tisular.

#### 1.1.4. Nefropatía CFHR5.

En colaboración con el grupo del Dr. Pickering en el Imperial College de Londres, hemos conseguido identificar el defecto genético subyacente a dos familias de descendencia chipriota que presentaban un fenotipo clínico común al que nombraron nefropatía CFHR5 y que cursaba con: hematuria microscópica persistente y macroscópica recurrente, glomerulonefritis C3 y fallo renal progresivo. Mediante estudios de desequilibrio de ligamiento, el grupo del Dr. Pickering había observado que la patología segregaba predominantemente con un haplotipo extendido dentro de la zona del RCA donde se encuentran los genes *CFH* y *CFHR1-5*. Secuenciaron varios de estos genes sin encontrar ninguna mutación concreta que pudiese explicar la patología. Mediante MLPA, hemos identificado una duplicación de los exones 2 y 3 del gen *CFHR5* (SCRs 1 y 2, FHR5<sup>12123-9</sup>). Tras realizar estudios poblacionales, en cohortes de pacientes con fenotipo similar procedentes de países diferentes, el grupo del Dr. Pickering ha visto que esta duplicación solo se encuentra en población enferma procedente de Chipre donde, a juzgar por el tamaño del haplotipo con el que viaja, se produjo hace unas 16 generaciones y desde entonces se ha transmitido por la isla. FHR5<sup>12123-9</sup> es una proteína más larga que FHR5 salvaje y se encuentra presente en plasma a mayor concentración que esta. Además, tiene una afinidad reducida por componentes del complemento tanto unidos a membrana como presentes en el glomérulo de ratón. Sin embargo, recientemente, mediante ensayos de SPR, se ha observado que el FHR5 mutante forma complejos más estables con C3b e iC3b. La cinética de unión del mutante a iC3b sugiere una interacción compleja en la que intervendrían cambios conformacionales que no se observa en la proteína salvaje (Goicoechea de Jorge, comunicación personal). El mecanismo por el que FHR5<sup>12123-9</sup> predispone para la nefropatía CFHR5 está siendo actualmente investigado, aunque los datos de los estudios funcionales aquí comentados podrían sugerir que FHR5<sup>12123-9</sup>, al unirse más fuertemente a C3b, compite con fH en la inactivación proteolítica por fI de C3b a iC3b. Además, el supuesto cambio conformacional que le produciría a iC3b podría evitar la eliminación de este producto de inactivación de C3 todo esto produciendo una desregulación de la AP del complemento sobre las superficies activadoras.

Todos estos estudios confirman los genes *CFHR1-5*, y en especial *CFHR1*, como nuevos genes que deben ser estudiados en los pacientes con estas patologías renales ya que pueden tener interés en el diagnóstico genético y tratamiento, así como influir en el fenotipo clínico de pacientes con más factores de riesgo.

#### 1.2. DAF

Pese a los datos obtenidos en los *CFHR1-5* el porcentaje de casos de aHUS sin causa conocida sigue siendo bastante alto. El siguiente gen objeto de estudio ha sido el de DAF, que junto con MCP, son los principales reguladores de la vía alternativa del complemento en superficies celulares. Dado que previamente se habían encontrado mutaciones en MCP asociadas con aHUS indicando una desregulación de la AP del complemento en superficies (Richards *et al.* 2003; Esparza-Gordillo *et al.* 2005; Caprioli *et al.* 2006; Richards *et al.* 2007), hemos comenzado secuenciando el exón 6 de DAF que es el que codifica para el SCR4, fundamental en la disociación de la convertasa de C3 de la AP (Harris *et al.* 2007), en busca de mutaciones que pudiesen conducir a este mismo defecto en la superficie del endotelio renal predisponiendo para aHUS. En toda nuestra cohorte de pacientes no hemos encontrado ninguna mutación. Lo mismo ha sido observado por el grupo de Newcastle (Inglaterra) quienes han secuenciado el gen completo de DAF en todos sus pacientes con aHUS habiendo encontrado únicamente un cambio sin consecuencias funcionales en uno de sus pacientes (Kavanagh *et al.* 2007). Esto parece indicar que en aHUS el control de los productos de activación de C3 puede tener más peso en el desarrollo de la enfermedad que el control de la convertasa de C3.

#### 1.3. C4BP

A mediados del 2008 se publicó un artículo en el que se asociaba un polimorfismo en el exón 7 del gen de C4BPA (c.719A>G, R240H) con aHUS (Blom *et al.* 2008). Los estudios funcionales de este polimorfismo presentados en este artículo mostraban que la proteína con el alelo 240H poseía una menor capacidad cofactora para la proteólisis de C3b por fI con respecto a la portadora del otro alelo. El análisis estadístico que realizaron fue en una cohorte de pacientes en la que había individuos emparentados, sobreestimando el valor real de significación, además no consiguieron replicar los resultados en una población de aHUS independiente. A la vista de esto, hemos intentado replicar el estudio en nuestra cohorte de pacientes. Hemos analizado pacientes con aHUS y controles todos del mismo origen geográfico. Desafortunadamente, al estudiar la población



española no hemos visto asociación estadística de este polimorfismo con aHUS. Una posible explicación puede ser que la frecuencia de este polimorfismo varíe de una población a otra, lo cual es especialmente crítico en aHUS donde disponemos de un número limitado de individuos y de orígenes geográficos distintos pudiendo esto distorsionar las frecuencias reales alterándose así los estudios estadísticos. En el laboratorio, se había estudiado el polimorfismo p.R240H desde 1983 en familias de la zona de Nueva York y España observándose una frecuencia de entre 0,78 y 3,7. Las frecuencias del polimorfismo 240H presentados por Blom y colaboradores (Blom *et al.* 2008) en sus dos cohortes de pacientes y controles está dentro de este rango. En nuestro estudio, además de la cohorte de aHUS hemos estudiado otra de AMD y sus dos cohortes respectivas de controles, todos ellos españoles, observándose la misma frecuencia de portadores del alelo 240H en todos los grupos. Viendo esto, nuestros datos no apoyan la asociación del polimorfismo p.R240H con aHUS. A pesar de que los estudios funcionales le dan una asociación biológica compatible con riesgo para aHUS, la estadística es clara de tal forma que hemos descartado la inclusión de este polimorfismo en nuestros estudios rutinarios en pacientes de aHUS.

Recientemente en C4BP, se había descrito que el polimorfismo rs11120218 del promotor de *C4BPB* estaba asociado con la disminución de niveles de este regulador en plasma (Buil *et al.* 2010). A la vista de estos datos, decidimos analizar este SNP en nuestra cohorte de pacientes con aHUS para ver si una bajada de sus niveles podría estar asociada con riesgo para aHUS. El estudio casos-contróles no muestra ninguna asociación del polimorfismo con la patología por lo que hemos descartando el análisis de este gen en los pacientes con aHUS.

## 2. Activadores de la AP del complemento.

Ya que tanto aHUS como DDD se producen por un exceso de activación del complemento, era lógico pensar que se podrían encontrar mutaciones en los activadores de la AP del complemento, que diesen un sistema del complemento más activo y difícil de regular. Esta hipótesis se demostró en las mutaciones ganancia de función encontradas en el laboratorio en el gen *CFB* (Goicoechea de Jorge *et al.* 2007). Dado que el fB no es el único activador de la AP del complemento, hemos secuenciado los activadores *C3* y *properdina* en busca de posibles mutaciones que pudiesen llevar a una ganancia de función y a una hiperactivación del complemento compatible con alguna de estas dos enfermedades renales.

### 2.1. Properdina

El gen de properdina se encuentra codificado en el cromosoma X por lo que los hombres solo tienen una copia de este. Cualquier polimorfismo a nivel genético en estos se vería en el cromatograma de secuenciación como un cambio en homocigosis. Sin embargo, hemos encontrado una mutación en heterocigosis (c.844C>T, p.282R>W) en un paciente de género masculino. Hemos analizado por MLPA el número de copias del gen de properdina y del cromosoma X para intentar explicar este fenómeno. Nuestros datos muestran que este paciente solo tiene un cromosoma X y una copia del gen de properdina (Fig. 13). Este fenómeno podría ser explicado por una duplicación de esta secuencia en otra región del genoma. La supuesta mutación se encontraría dentro del dominio TSR2 de properdina cuya función es desconocida no pudiéndose plantear un modelo que explique por qué esta supuesta proteína mutante predispondría para aHUS. No hemos encontrado ninguna otra mutación en nuestras cohortes de pacientes de aHUS ni DDD por lo que hemos descartado introducir este gen en el análisis rutinario de los pacientes con estas patologías.

### 2.2. C3.

En la secuenciación de C3 se encontraron 4 mutaciones en nuestra cohorte de pacientes con aHUS: c.481C>T (Arg161Trp), c.1601A>T (Tyr534Phe), c.1774C>T (Arg592Trp) y c.3470T>C (Ile1157Thr). Pese a que en la secuencia se encuentran muy separadas, en la estructura de C3b se encuentran muy cerca entre ellas y del polimorfismo R102G que se ha asociado con riesgo para AMD (Maller *et al.* 2007; Yates *et al.* 2007) (Fig. 16). Además, se encuentran en la región en la que actúan los reguladores de la AP del complemento. Decidimos caracterizar estas mutaciones funcionalmente para entender mejor como afectan a la regulación del complemento y explicar su asociación con aHUS. Nuestros resultados han demostrado que las mutaciones de C3 asociadas con aHUS producen una desregulación de la AP del complemento en superficie pero, esto será discutido detalladamente más adelante. Por otra parte, el hallazgo de mutaciones en este gen en pacientes con aHUS ha confirmado C3 como uno de los genes a tener en cuenta en el diagnóstico genético de esta afección renal, confirmando resultados obtenidos en otras cohortes europeas (Fremaux-Bacchi *et al.* 2007).

DDD esta también asociado con una hiperactivación de la AP del complemento debida sobre todo a la falta o defecto funcional de fH y a la presencia del factor nefrítico. DDD es una

enfermedad extremadamente rara impidiendo reunir cohortes de pacientes suficientemente grandes y homogéneas como para realizar estudios casos-controles que pudieran llegar a identificar polimorfismos de riesgo. El caso de los pacientes de DDD es similar al de aHUS en el sentido de que el defecto genético no es conocido en todos ellos y es necesaria la búsqueda de nuevos factores de riesgo. Hemos secuenciado C3 en nuestra cohorte de pacientes con DDD en busca de mutaciones ganancia de función que pudiesen explicar esta desregulación de la AP del complemento. Hemos encontrado una mutación en C3 (c.2767\_2774delACGGTG 923ΔDG) en una familia

con varios afectados en los que la mutación segrega con la patología. Los casos familiares de DDD son raros y normalmente asociados con deficiencias de fH lo que confiere a nuestra mutación un valor añadido. La progresión de la patología en los individuos ha sido común para todos ellos y para los tres trasplantes del caso índice. El diagnóstico a nivel de biopsia no deja duda de que la enfermedad es una DDD. Esta ha sido la primera mutación en C3 asociada en DDD descrita hasta el momento abriendo el campo de las mutaciones ganancia de función en esta severa patología renal.

## Correlación fenotipo-genotipo.

*Era sabido que aHUS tenía una penetrancia incompleta en individuos con mutaciones en genes del complemento. Además, pacientes con mutaciones en los mismos genes desarrollaban distintos fenotipos clínicos. Con el fin de clarificar a que se debían estos dos fenómenos hemos estudiado la correlación fenotipo-genotipo en portadores de la mutación en fH asociada con aHUS R1210C. Hemos observado una confluencia de factores de riesgo en los individuos enfermos de cada familia, así como el hecho de que la severidad de la patología depende de la cantidad de otros factores de riesgo adicionales que el individuo porta. Del mismo modo, hemos caracterizado funcionalmente los polimorfismos de riesgo asociados con AMD y aHUS, fH<sub>V62I</sub> y C3<sub>R102G</sub>, que nos han mostrado que alteran la actividad del complemento, ayudándonos a entender por qué estos polimorfismos predisponen para patología. Combinando en ensayos hemolíticos las variantes de riesgo de todos los polimorfismos de proteínas del complemento asociados con AMD, hemos visto que estos conducen a una mayor capacidad hemolítica sugiriendo, que producen un sistema del complemento más activo que predispone al daño tisular característico de esta y otras patologías.*

Desde hacía tiempo, se sabía que en los individuos enfermos de las familias con aHUS, se observaba una concurrencia de factores de riesgo (Esparza-Gordillo *et al.* 2005) que podían ser tanto genéticos como ambientales (Esparza-Gordillo *et al.* 2004). Por otra parte, aHUS tiene una penetrancia incompleta en individuos con mutaciones en genes del complemento de alrededor del 30% y, se sabía que, pacientes con aHUS portadores de mutaciones en los mismos genes, presentaban fenotipos clínicos diferentes. Esta parte de la tesis se ha centrado en estudiar e intentar profundizar en el conocimiento de estos fenómenos.

### 1. R1210C

Con el fin de intentar estudiar el peso de los distintos marcadores genéticos de riesgo para aHUS, hemos realizado un estudio con portadores de la mutación R1210C en fH en los que hemos intentado correlacionar el fenotipo clínico con el genotipo que presentan. A pesar de que las mutaciones en CFH se consideran únicas, encontrándose una sola vez en un individuo o en una familia, esta mutación ha sido encontrada en las cohortes de pacientes con aHUS de Italia, Reino Unido, Australia, Alemania, Francia y Estados Unidos. En este estudio, hemos reunido

muestras de todos los pacientes portadores de la mutación y de sus respectivas familias siendo 5 casos familiares y 7 casos esporádicos, sumando un total de 11 pacientes no relacionados y dos hermanos. De esta manera, hemos podido estudiar más fácilmente el efecto de otros factores de predisposición a patología en individuos con un defecto genético basal similar. Al ser una mutación tan prevalente, lo primero que hemos realizado han sido estudios de haplotipos en los portadores para identificar su origen. Estos análisis nos han mostrado que la mutación R1210C viaja con un haplotipo de CFH muy raro en población caucásica pero muy frecuente en población africana, sugiriendo que llegó a Europa desde África. La mutación R1210C se ha ido estableciendo como un polimorfismo muy poco frecuente en las poblaciones de origen caucásico pero que predispone a padecer aHUS.

Los datos clínicos de todos los pacientes portadores son muy heterogéneos pese a tener la misma mutación. Además, hay 16 familiares portadores de la R1210C pero que no han desarrollado la patología confirmándose la penetrancia incompleta de un 30% en las mutaciones en fH en pacientes con aHUS. A la vista de los datos, se hacía de especial interés el estudio de otros factores de riesgo y la correlación con la presencia y severidad de la patología en los portadores de esta mutación. Hemos secuenciado el resto de los genes del complemento asociados con aHUS y analizado los haplotipos de riesgo en MCP y CFH (Esparza-Gordillo *et al.* 2005; Pickering *et al.* 2007) y la delección CFHR1-CFHR3. Esto nos ha mostrado que los pacientes portadores de mutaciones en MCP, otras mutaciones en CFH o la mutación R1210C en homocigosis desarrollan la enfermedad a una edad más temprana que el resto y, en la mayoría de los casos, con un fenotipo más severo. Así mismo, hemos visto que dentro de las familias, en los enfermos confluyen los factores de riesgo desde sus progenitores de tal forma que, individuos con padres sanos sufren aHUS. Es interesante comentar que un paciente de la cohorte alemana, que no poseía ningún factor de riesgo, a excepción de la mutación R1210C, desarrolló un episodio de la enfermedad y no ha tenido recurrencia dando mayor peso a la correlación fenotipo-genotipo que estamos discutiendo.

Los resultados que hemos obtenido confirman estudios previos en los que se defendía la confluencia de factores de riesgo a la hora de desarrollar aHUS (Esparza-Gordillo *et al.* 2005). Además hemos confirmado que la severidad de la patología, en pacientes con la misma base genética, esta influida por factores de riesgo en otros genes del complemento.

## 2. Polimorfismos y "complotipo".

Debido a la importancia que los factores de riesgo tienen en la penetrancia y severidad de aHUS, en los últimos años se han llevado a cabo varios estudios para intentar dilucidar el efecto que tienen sobre la actividad del sistema del complemento. Se sabía que el haplotipo MCP<sub>ggac</sub> confería riesgo para aHUS, posiblemente, como consecuencia de la reducción de sus niveles de expresión y, por lo tanto, en la cantidad de moléculas de este regulador sobre la superficie de las células. Esta reducción en los niveles de MCP puede exacerbar un defecto en la regulación del complemento sobre superficies celulares predisponiendo a daño tisular (Esparza-Gordillo *et al.* 2005).

El polimorfismo en fB<sub>R32QW</sub> había sido asociado con AMD (Gold *et al.* 2006). En un trabajo reciente por Montes y colaboradores (Montes *et al.* 2009) se demostró que la variante fB<sub>32R</sub> de este polimorfismo forma la convertasa de C3 con más afinidad que las otras dos variantes de las cuales, fB<sub>32Q</sub> tenía 4 veces menos afinidad por C3b y la fB<sub>32W</sub> tenía una afinidad intermedia entre ambas. Esto quiere decir que el alelo fB<sub>32R</sub> de fB da un sistema del complemento más activo que los otros dos, siendo probablemente esta, la causa de su asociación con esta enfermedad crónica de daño tisular.

Con estos precedentes, nos propusimos estudiar el por qué el polimorfismo de fH p.V62I confiere protección para aHUS, DDD y AMD (Pickering *et al.* 2007). Hemos purificado fH de plasma de portadores homocigotos para ambas variables y realizado ensayos funcionales mediante técnicas de ELISA, experimentos de actividad cofactora en fase fluida y ensayos de SRP en colaboración con la Dra. Harris y el Dr. Morgan de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cardiff (Gales). Con nuestros resultados, hemos demostrado que la variante fH<sub>62I</sub> une C3b con más eficiencia que la fH<sub>62V</sub>. Este aumento de afinidad tiene dos efectos: por un lado fH<sub>62I</sub> actúa mejor como cofactor para fI en la inactivación de C3b y, por otro lado, inhibe mejor la formación de la convertasa ya que compite más eficazmente por el sitio de unión con fB. Sin embargo, no hemos visto ninguna diferencia a nivel de la disociación de la convertasa de C3 de la AP del complemento. Este hecho muestra que las regiones del SCR1 dedicadas a la disociación de la convertasa y a la actividad cofactora son distintas. Nuestros resultados explican porque fH<sub>62I</sub> al dar un sistema del complemento mejor regulado, disminuye las probabilidades de daño tisular actuando así como un factor protector para estas enfermedades crónicas.

Del mismo modo que los polimorfismos anteriores, el alelo G del SNP de C3 p.R102G se había asociado con AMD (Maller *et al.* 2007; Yates *et al.* 2007). AMD es una enfermedad fuertemente asociada con polimorfismos en genes del complemento, y con una elevada prevalencia a nivel mundial, siendo la principal causa de ceguera en los países desarrollados. Esto hacía de especial interés una caracterización funcional que explicase que efecto en la actividad del complemento podía tener este polimorfismo. Tras purificar la proteína de donantes homocigotos hemos realizado estudios mediante SPR y ensayos de hemólisis en colaboración con el grupo de la Dra. Harris y el Dr. Morgan. Nuestros estudios muestran que C3<sub>102G</sub> tiene una menor afinidad por fH que el otro alelo (C3<sub>102R</sub>), produciéndose una mayor resistencia de su convertasa a la disociación por este regulador y, del mismo modo, una mayor resistencia del C3b a ser inactivado por fI con fH como cofactor. El resultado de este cambio funcional es un sistema del complemento más activo que favorece la aparición de AMD.

El hecho de tener caracterizados todos estos SNPs de riesgo para patologías asociadas con el complemento, nos hizo preguntarnos como afectaría a la acción global del complemento la suma de todas estas variantes de riesgo en forma de "complotipos". Mediante ensayos hemolíticos en los que a un plasma control le hemos ido deplecionando de proteínas del complemento y reconstituyendo con las distintas variantes, hemos observado el efecto aditivo que estos polimorfismos tienen en la acción global de esta parte del sistema inmunitario. En una primera aproximación en la que hemos añadimos C3<sub>102G</sub> y fB<sub>32R</sub> a un plasma deplecionado de ambos activadores, hemos comparado su capacidad hemolítica con otro al que hemos añadido C3<sub>102R</sub> y fB<sub>32Q</sub> y observando que la primera combinación es 3,8 veces más hemolíticamente activa que la segunda. El resto de las combinaciones con estos dos SNPs dan una actividad intermedia similar. Posteriormente, hemos introducido en el experimento el polimorfismo de riesgo en fH<sub>V62I</sub>. Sustituyendo en un plasma control fB, C3 y fH por las variantes de riesgo C3<sub>102G</sub>, fB<sub>32R</sub> y fH<sub>62V</sub> y por el otro lado las de protección C3<sub>102R</sub>, fB<sub>32Q</sub> y fH<sub>62I</sub>, hemos observado que la capacidad hemolítica es 6 veces mayor en el caso de las variantes de riesgo que en las de protección. Con esto confirmamos que los alelos de riesgo para AMD de los distintos componentes del sistema del complemento tienen un efecto aditivo en su actividad mientras que las variantes de protección la reducen. El mantenimiento de la homeostasis en un sistema depende del equilibrio entre activación y regulación. Un individuo que herede las variantes que

aumentan la actividad del complemento será capaz de eliminar mejor las infecciones aunque tendrá más predisposición a enfermedades inflamatorias. Por otro lado, otro que sea portador de las variantes de menor actividad tendrá más predisposición a infecciones.

Nuestros resultados han ayudado a interpretar por qué la suma de polimorfismos de riesgo en genes del complemento varía el fenotipo de la patología. En individuos con aHUS la actividad extra que le pueden otorgar al sistema del complemento estos polimorfismos puede ser la

causante de un aumento en el daño tisular, haciendo que el fenotipo de los pacientes sea más severo o que la patología se desarrolle antes. Del mismo modo, un individuo portador de una mutación en un gen del complemento desarrollará la patología solo si la suma de la desregulación causada por esta mutación, y el estado basal de activación del complemento causada por los polimorfismos de riesgo es suficiente para desestabilizar el sistema, explicándose así la penetrancia incompleta de las mutaciones en genes del complemento en aHUS.



## Caracterización funcional de mutaciones en C3

*La última parte de esta tesis se ha centrado en caracterizar funcionalmente las mutaciones encontradas en el gen de C3 en DDD y aHUS para explicar su asociación con ambas patologías. Hemos realizado estudios de SPR y ensayos en fase fluida para poner de manifiesto los defectos funcionales que predisponen a estas dos afecciones renales. El C3 con la mutación encontrada en DDD ha resultado ser resistente a la activación por la convertasa de C3 de la AP del complemento pero, tras su activación espontánea, ser capaz de formar una convertasa activa. Esta convertasa mutante, es resistente a la disociación por fH pero no por DAF. Igualmente, las formas activas de este C3 mutante son resistentes a la proteólisis por fI con fH como cofactor pero no si usamos MCP como cofactor. Esto da idea de que DDD se produce por una desregulación del complemento en fase fluida. Por otro lado, las mutaciones en C3 asociadas con aHUS, muestran la situación contraria a DDD, siendo inactivadas por fI en presencia de fH pero no en presencia de MCP. Nuestros datos confirman que aHUS se produce por defecto de regulación de la AP del complemento en superficies celulares mientras que demuestran que en DDD la desregulación ocurre en fase fluida. Finalmente, nuestros datos han mostrado que los distintos reguladores de la AP del complemento tienen requerimientos estructurales diferentes para su acción. Todo esto tiene un gran interés en el desarrollo de posibles terapias.*

La caracterización funcional de las mutaciones en C3 era necesaria para confirmar este gen como de riesgo para aHUS y DDD. Un gran reto ha sido el intentar entender por qué, mutaciones en la misma proteína predisponen para sufrir una patología y no otra, ya que en ambos casos el factor común es una desregulación de la vía alternativa del complemento.

### 1. Caracterización funcional de mutaciones en C3 asociadas con DDD.

Los estudios realizados tienen una complicación añadida ya que producir C3 en cultivos de células eucariotas en cantidades suficientes para ser purificada y realizar ensayos funcionales es especialmente complicado. Por esto, la purificación de los C3 mutantes la hemos llevado a cabo desde el plasma de los mismos pacientes, con la limitación que conlleva trabajar con proteínas en heterocigosis.

Además hay que añadir, que los pacientes con DDD normalmente no tienen C3 circulante ya que es consumido totalmente por su sistema del complemento hiperactivado. A este respecto, los portadores de la mutación asociada con DDD, C3<sup>923ADG</sup> son excepcionales ya que sus niveles de C3 son normales, haciendo posible su purificación desde plasma. Además, hemos desarrollado un sistema para poder separar la proteína mutante (C3<sup>923ADG</sup>) de la salvaje, en el C3 total purificado del plasma del paciente, mediante un gradiente de pH en una columna de intercambio catiónico, haciéndonos posible el estudio en profundidad de esta mutación. Nuestros estudios sobre C3<sup>923ADG</sup> han ayudado a comprender el mecanismo patogénico de DDD, campo en el que había muchos interrogantes.

#### 1.1. Desregulación de la AP del complemento.

C3<sup>923ADG</sup> es la proteína mayoritaria en plasma de los portadores, donde circula en su conformación nativa, como se ve en las reconstrucciones tridimensionales obtenida mediante microscopía electrónica. Tras su activación a iC3 por hidrólisis espontánea o corte a C3b por proteasas plasmáticas, es capaz de formar una convertasa activa ya que la mutación esta lejos de la región de interacción de C3b o iC3 con fB. Sin embargo, esta proteína mutante, no es sustrato ni de su propia convertasa ni de una convertasa salvaje.

Estos datos no nos han conseguido explicar totalmente como C3<sup>923ADG</sup> es capaz de desregular la AP del complemento causando DDD. Para ello hemos realizado ensayos funcionales con los reguladores del complemento. Hemos visto que la convertasa mutante es resistente a ser disociada por fH, sin embargo, DAF la disocia eficientemente. Del mismo modo, las formas activadas de C3 (C3b o iC3) son resistentes a la inactivación por fI con fH como cofactor pero en presencia de MCP son inactivadas rápidamente. Con estos datos hemos podido entender el mecanismo patogénico desencadenado por esta mutación. Las formas activas de C3<sup>923ADG</sup> que se producen espontáneamente en los portadores, permanecen en plasma ya que no pueden ser inactivadas por fI con fH como cofactor pero no se acumulan en la membrana ya que MCP si que puede inactivarlas por medio de fI. Estas formas activas, son capaces de ensamblar una convertasa de C3 de la AP que activa el C3<sup>WT</sup> produciendo un bucle de amplificación que lo consume casi totalmente. La combinación de una convertasa activa regulable en superficies pero no regulable en fase fluida que consume el C3<sup>WT</sup>, junto con la imposibilidad del C3 mutante de ser activado por la convertasa de C3 de la AP, son las causa de que C3<sup>923ADG</sup> sea la proteína mayoritaria en el plasma de los pacientes. Además, esta consunción de C3<sup>WT</sup> es la

causante de la deposición de fragmentos de inactivación de C3 en el glomérulo renal que conducen a DDD.

Los estudios animales sostenían que esta enfermedad se producía por una desregulación del complemento en fase fluida, sin embargo, no se sabía si esto era lo que ocurría también en humanos. Esta mutación demuestra que DDD es una enfermedad que puede ser causada únicamente por una desregulación de la vía alternativa del complemento en fase fluida que conduce a una consunción del C3 plasmático y la consiguiente deposición de sus productos de inactivación en el glomérulo renal causando la patología.

### 1.2. Interacción con los reguladores.

A nivel estructural C3<sup>923ADG</sup> saca a la luz nuevos datos a cerca de la regulación de la vía alternativa del complemento. Los reguladores se sabía que se unían aproximadamente en la misma región del C3b pero actuaban de forma diferente (**Fig. 16**). Este mutante altera la región de C3b donde interaccionan los reguladores, sin embargo, sólo se ve afectada la función de fH y no las de DAF y MCP sugiriendo una forma diferencial de actuación de los reguladores de superficie con respecto a los de membrana, a pesar de que tienen dominios activos similares.

Los dos primeros SCR de fH son los que poseen la actividad reguladora. Su afinidad por la molécula de C3b debe ser mayor que la de fB ya que, de no ser así, no sería capaz de competir por C3b evitando la formación de la proconvertasa de C3 de la AP y, una vez formada la convertasa, no sería capaz de desplazar el fragmento Bb para disociarla (Gordon *et al.* 1995; Kuhn *et al.* 1995). Es por esto, por lo que la distorsión causada por la mutación en la zona del MG7 donde interacciona fH le impide a este regulador ejercer su acción de disociación. Por el contrario, las regiones más importantes para la función de DAF son los SCR 3 y 4 (Harris *et al.* 2007; Kuttner-Kondo *et al.* 2007). Estos dominios interaccionan con C3b en el TED y MG1 principalmente por lo que la mutación localizada en el dominio MG7 de C3 no afecta su función.

De la misma forma, C3<sup>923ADG</sup> pone de manifiesto la diferente forma de actuación de MCP con respecto a fH. Como acabamos de mencionar, los dominios con la capacidad reguladora de fH son los SCR 1 y 2 que interaccionan con el MG7. En MCP los dominios importantes para su acción son los SCR 3 y 4 que interaccionan entre el TED y MG1 al igual que ocurría con DAF (Liszewski *et al.* 2007; Richards *et al.* 2007). La mutación distorsiona la zona de interacción de fH para su actividad cofactora pero no de MCP explicándose con todo esto porque los

reguladores de superficie no se ven afectados por C3<sup>923ADG</sup> mientras que fH sí.

### 1.3. Interacción de la convertasa con el sustrato.

A parte de la regulación de la vía alternativa del complemento, C3<sup>923ADG</sup> desvela varios detalles importantes sobre la activación de la AP del complemento. Se ha descrito que la interacción de la convertasa con su sustrato se da en regiones de los dominios TED, MG3, MG4-5 y MG6-8 de las mismas caras de C3 y C3b (Rooijakkers *et al.* 2009). Además, se ha desarrollado un anticuerpo anti-C3b que bloquea la actividad de la convertasa y que se une a C3b muy cerca de la mutación C3<sup>923ADG</sup> (Katschke *et al.* 2009). Estos datos junto con el hecho de que este C3 mutante no es sustrato de la convertasa sugieren que la región del MG7 donde se encuentra la mutación interviene de alguna forma en el reconocimiento del sustrato por parte de la convertasa de C3 de la AP. En la figura suplementaria 6 del artículo publicado en "*The Journal of Clinical Investigation*" incluida en esta tesis (Martínez-Barricarte *et al.* 2010), se muestra la posible estructura de la convertasa de C3 con su sustrato. C3<sup>923ADG</sup> podría distorsionar la interacción convertasa-sustrato separando los dos MG7 de las moléculas de C3 y C3b, haciendo que el dominio serina-proteasa del fB no llegue a alcanzar el sitio de corte de C3 explicándose así porque esta C3<sup>923ADG</sup> no puede ser sustrato de la convertasa de la vía alternativa del complemento.

Por otro lado, hemos visto que la convertasa formada con iC3 es más activa que la formada con C3b. La explicación de este fenómeno está en la presencia del fragmento C3a que debe tener también alguna función en la actividad o ensamblaje de esta convertasa. Nuestros resultados confirman estudios previos que indicaban que la convertasa de C3 formada con iC3 es capaz de activar más eficazmente la AP del complemento (Bexborn *et al.* 2008). Finalmente, nuestra mutación se encuentra lejos de la región de interacción de fB con C3b por lo que no hemos observado ninguna alteración en la formación de la convertasa de C3 de la AP del complemento.

### 1.4. Terapia

Los datos obtenidos mediante los estudios funcionales de las mutaciones en C3, son de mucha utilidad a la hora del desarrollo de posibles fármacos y terapias para pacientes con DDD. En el caso de los pacientes portadores de C3<sup>923ADG</sup>, tratamientos de infusión o transfusión de plasma que se usan rutinariamente serían totalmente desaconsejados y contraproducentes. El añadir plasma, que contendría C3 salvaje, a estos pacientes

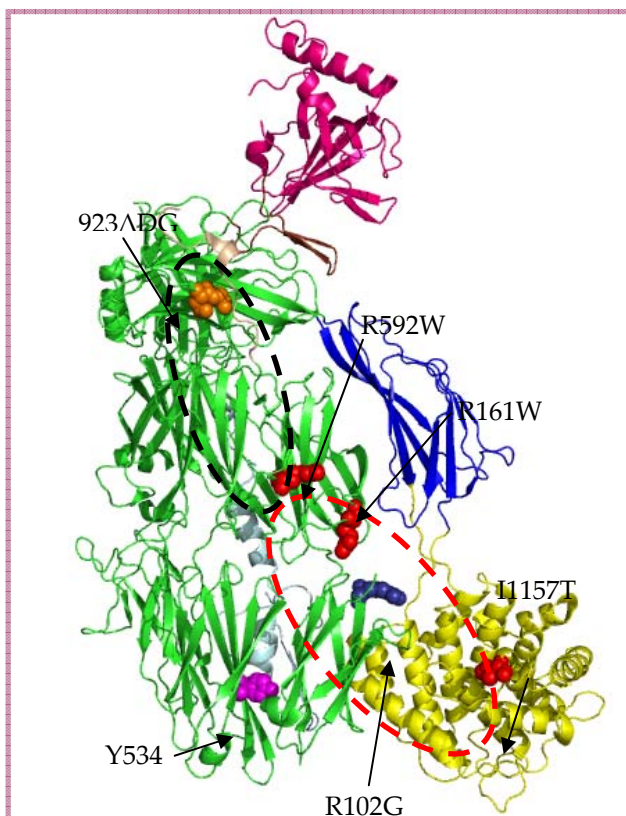
produciría la activación descontrolada del C3<sub>WT</sub> por parte del C3 mutante que lo consumiría. Los productos de inactivación del C3<sub>b</sub><sub>WT</sub> se depositaría en el glomérulo del paciente agravando la enfermedad. En este caso se podrían utilizar reguladores de membrana pero en estado soluble (sDAF y sMCP) que podrían suplir los defectos de fH para regular el C3 mutante. Además el estudio más profundo a nivel estructural del C3<sub>923ΔDG</sub> podría ayudar a desarrollar anticuerpos u otras moléculas que bloqueasen la actividad de la convertasa de C3 de la vía alternativa del complemento, pudiendo ser utilizadas en situaciones y enfermedades donde el complemento esté tan hiperactivado que supongan un riesgo para el individuo.

## 2. Caracterización funcional de mutaciones en C3 asociadas con aHUS.

Como hemos comentado en la primera parte de esta discusión, hemos encontrado también mutaciones en C3 en nuestra cohorte de pacientes con aHUS. Antes de purificar los C3s mutantes desde el plasma de los pacientes hemos comprobado que estos se expresaban en células eucariotas. Ya con la proteína purificada, hemos realizado ensayos de actividad cofactora en fase fluida y SPR con ayuda del grupo de la Dra. Harris y el Dr. Morgan. Los resultados obtenidos han demostrado una disminución de la afinidad de MCP por los C3bs mutantes sin ninguna alteración con respecto a fH. Esto trae consigo un defecto en la inactivación de los C3bs mutantes por medio de fI utilizando MCP como cofactor. Al contrario que lo que ocurre en la mutación de DDD, estas mutaciones conducen a un defecto en la regulación de la AP del complemento sobre superficies, siendo totalmente regulables en plasma. Todas las mutaciones de nuestra cohorte manifestaban este descenso de la actividad de MCP salvo la mutación Y534P procedente de un paciente tunecino. Y534P se comporta en los ensayos de actividad cofactora como un C3 salvaje haciéndonos suponer que es, tal vez, un polimorfismo de frecuencia muy baja procedente de la zona del norte de África.

Las mutaciones encontradas están localizadas en los dominios MG2 (R161W), MG6 (R592W) y TED (I1157T). A pesar de que se encuentran en dominios distintos, observando la estructura de la Fig. 16, se puede ver que están relativamente cerca entre ellas pero separadas de la mutación C3<sub>923ΔDG</sub>. La mutación encontrada en el paciente tunecino (Y534P) altera un aminoácido no expuesto en el MG5 lo que explicaría la falta de implicación funcional de este mutante.

Nuestros datos de mutaciones en C3 ponen de manifiesto las diferentes regiones importantes para la acción de los reguladores. A pesar de que DAF, MCP y fH están compuestos por el mismo tipo de dominios e interaccionan con C3b en la misma región, los datos expuestos en esta tesis plantean un diferente requerimiento estructural. La acción de fH se encuentra concentrada en los dos primeros SCRs que interaccionan con C3b alrededor del MG7. Esto se pone de manifiesto teniendo en cuenta que compete con fB por C3b necesitando estos dos primeros SCRs una mayor afinidad por la molécula de C3b que los siguientes. La actividad de disociación de fH se realiza uniendo C3b y desplazando Bb. Del mismo modo la actividad cofactora está localizada en el SCR2 que une fI haciendo posible la inactivación de C3b. Los reguladores de membrana tienen un funcionamiento distinto. DAF disocia la convertasa utilizando sobre todo sus dominios SCR 3 y 4 que se encuentran localizados justo donde se encuentran las mutaciones de C3 asociadas con aHUS (Harris *et al.* 2007; Kuttner-Kondo *et al.* 2007). Por su parte los dominios SCR 3 y 4 de MCP son suficientes para actuar de cofactor para fI en la proteólisis de C3b



**Fig. 16. Localización de las mutaciones en C3b.** Estructura tridimensional de la molécula de C3b donde se encuentran marcadas las mutaciones encontradas en nuestras cortes de aHUS y DDD y el SNP R102G. El óvalo punteado rojo indica la zona importante de interacción para los reguladores de membrana (SCR3-4) mientras que el negro indica la zona importante para la unión de fH (SCR1-2)

(Harris, comunicación personal). El mecanismo por el que esto puede ocurrir no es bien conocido pero se piensa que estos SCRs separan el domino TED del anillo formado por los MGs haciendo accesible a fl las regiones del domino CUB que van a ser cortadas permitiéndole realizar su función (Wu *et al.* 2009). Estas hipótesis de acción de los reguladores se ven corroboradas por los datos obtenidos de nuestras mutaciones. Por un lado, mutaciones en la región de interacción de los SCRs 3 y 4 de los reguladores disminuyen la capacidad de acción de los de membrana cuyos dominios importantes de unión a C3b se encuentran localizados aquí. Por otra parte las mutaciones en la región de interacción de fH incapacitan este regulador sin alterar la función de MCP o DAF.

Finalmente, los datos presentados en esta tesis confirman que el patrón de complemento de aHUS muestra una desregulación de la AP en superficies celulares. Por otra parte esta es la primera vez en la que se prueba que DDD en humanos puede ser causada únicamente por la desregulación del complemento en fase fluida. De la misma forma que las mutaciones en fH asociadas con aHUS se encuentran en la zona C-terminal impidiendo la unión de este a superficies celulares (Rodríguez de Córdoba *et al.* 2004) en la molécula de C3b, hemos caracterizado las regiones importantes para la regulación en fase fluida y la regulación en superficies celulares haciendo así posible predecir el defecto que una mutación en esta molécula puede tener en un portador.



# Conclusiones





1. La identificación de reordenamientos y polimorfismos en los genes *CFHR1-5* asociados con patología sugiere que estas proteínas tienen un papel en la regulación de la vía alternativa del complemento, aunque este no esté todavía bien definido.
2. El análisis proteómico de FHR1 ha permitido definir aspectos novedosos de su asociación con patología. Uno es la identificación de un polimorfismo genético nuevo, relevante en aHUS, y otro, la asociación específica del déficit de FHR1 con la presencia de auto-anticuerpos anti-fH.
3. El análisis de pacientes portadores de la mutación R1210C en fH, nos ha permitido establecer el papel de polimorfismos y mutaciones en otros genes del complemento en la modulación de la penetrancia y presentación clínica de la patología.
4. La caracterización funcional de los polimorfismos fH<sub>V62I</sub> y C3<sub>R102G</sub> nos ha permitido establecer las bases moleculares de su asociación con enfermedades.
5. Las consecuencias funcionales de los polimorfismos en proteínas del complemento son aditivos y determinan diferencias constitutivas en la activación del complemento ("Complotipos") que, muy probablemente, modulen la predisposición a enfermedades infecciosas o inflamatorias.
6. Los estudios funcionales de las mutaciones en C3 asociadas con aHUS y DDD, confirman aHUS como una enfermedad causada por la desregulación del sistema del complemento en superficies celulares, mientras que implican la desregulación en fase fluida en el caso de DDD.
7. El análisis funcional y estructural de variantes de proteínas del complemento aporta información útil para comprender los mecanismos moleculares que subyacen a la activación y regulación del complemento.





# Bibliografía

1. Abbas, A. H., A. H. Lichtman, J. S. Pober (2000). Inmunología celular y molecular.
2. Abrera-Abeleda, M. A., C. Nishimura, J. L. H. Smith, S. Sethi, J. L. McRae, B. F. Murphy, G. Silvestri, C. Skerka, M. Jozsi, P. F. Zipfel, G. S. Hageman, R. J. H. Smith (2006). "Variations in the complement regulatory genes factor H (CFH) and factor H related 5 (CFHR5) are associated with membranoproliferative glomerulonephritis type II (dense deposit disease)." J Med Genet **43**(7): 582-589.
3. Amara, U., D. Rittirsch, M. Flierl, U. Bruckner, A. Klos, F. Gebhard, J. Lambris, M. Huber-Lang (2008). "Interaction between the coagulation and complement system." Adv Exp Med Biol. **632**: 71-79.
4. Appel, G. B., H. T. Cook, G. Hageman, J. C. Jennette, M. Kashgarian, M. Kirschfink, J. D. Lambris, L. Lanning, H. U. Lutz, S. Meri, N. R. Rose, D. J. Salant, S. Sethi, R. J. H. Smith, W. Smoyer, H. F. Tully, S. P. Tully, P. Walker, M. Welsh, R. Wurzner, P. F. Zipfel (2005). "Membranoproliferative Glomerulonephritis Type II (Dense Deposit Disease): An Update." J Am Soc Nephrol **16**(5): 1392-1403.
5. Barlow, P., D. Norman, A. Steinkasserer, T. Horne, J. Pearce, P. Driscoll, Sim RB, C. ID. (1992). "Solution structure of the fifth repeat of factor H: a second example of the complement control protein module." Biochemistry **31**(14): 3626-3634.
6. Barlow, P. N., A. Steinkasserer, D. G. Norman, B. Kieffer, A. P. Wiles, R. B. Sim, I. D. Campbell (1993). "Solution Structure of a Pair of Complement Modules by Nuclear Magnetic Resonance." J Mol Biol **232**(1): 268-284.
7. Bexborn, F., P. O. Andersson, H. Chen, B. Nilsson, K. N. Ekdahl (2008). "The tick-over theory revisited: Formation and regulation of the soluble alternative complement C3 convertase (C3(H<sub>2</sub>O)Bb)." Mol Immunol **45**(8): 2370-2379.
8. Blom, A. M., F. Bergstrom, M. Edey, M. Diaz-Torres, D. Kavanagh, A. Lampe, J. A. Goodship, L. Strain, N. Moghal, M. McHugh, C. Inward, C. Tomson, V. Fremeaux-Bacchi, B. O. Villoutreix, T. H. J. Goodship (2008). "A Novel Non-Synonymous Polymorphism (p.Arg240His) in C4b-Binding Protein Is Associated with Atypical Hemolytic Uremic Syndrome and Leads to Impaired Alternative Pathway Cofactor Activity." J Immunol **180**(9): 6385-6391.
9. Blom, A. M., L. Kask, B. Dahlbäck (2003). "CCP1-4 of the C4b-binding protein [alpha]-chain are required for factor I mediated cleavage of complement factor C3b." Mol Immunol **39**(10): 547-556.
10. Buil, A., D.-A. Tregouet, J. C. Souto, N. Saut, M. Germain, M. Rotival, L. Tiret, F. Cambien, M. Lathrop, T. Zeller, M.-C. Alessi, S. Rodriguez de Cordoba, T. Munzel, P. Wild, J. Fontcuberta, F. Gagnon, J. Emmerich, L. Almasy, S. Blankenberg, J.-M. Soria, P.-E. Morange (2010). "C4BPB/C4BPA is a new susceptibility locus for venous thrombosis with unknown protein S-independent mechanism: results from genome-wide association and gene expression analyses followed by case-control studies." Blood **115**(23): 4644-4650.
11. Caprioli, J., P. Bettinaglio, P. F. Zipfel, B. Amadei, E. Daina, S. Gamba, C. Skerka, N. Marziliano, G. Remuzzi, M. Noris (2001). "The Molecular Basis of Familial Hemolytic Uremic Syndrome: Mutation Analysis of Factor H Gene Reveals a Hot Spot in Short Consensus Repeat 20." J Am Soc Nephrol **12**(2): 297-307.
12. Caprioli, J., F. Castelletti, S. Bucchioni, P. Bettinaglio, E. Bresin, G. Pianetti, S. Gamba, S. Brioschi, E. Daina, G. Remuzzi, M. Noris (2003). "Complement factor H mutations and gene polymorphisms in haemolytic uraemic syndrome: the C-257T, the A2089G and the G2881T polymorphisms are strongly associated with the disease." Hum Mol Genet **12**(24): 3385-3395.
13. Caprioli, J., M. Noris, S. Brioschi, G. Pianetti, F. Castelletti, P. Bettinaglio, C. Mele, E. Bresin, L. Cassis, S. Gamba, F. Porrati, S. Bucchioni, G. Monteferrante, C. J. Fang, M. K. Liszewski, D. Kavanagh, J. P. Atkinson, G. Remuzzi, H. T. for the International Registry of Recurrent and Familial (2006). "Genetics of HUS: the impact of MCP, CFH, and IF mutations on clinical presentation, response to treatment, and outcome." Blood **108**(4): 1267-1279.
14. Dahlbäck, B., C. A. Smith, M.-E. H.J. (1983). "Visualization of human C4b-binding protein and its complexes with vitamin K-dependent protein S and complement protein C4b." Proc Natl Acad Sci **8**(11): 3461-3465.
15. De Podack, E. R. (1986). "Molecular mechanisms of cytolysis by complement and cytolytic lymphocytes." J Cell Biochem **30**: 133-170.
16. Esparza-Gordillo J, Soria JM, Buil A, Almasy L, Blangero J, Fontcuberta J, R. d. C. S. (2004). "Genetic and environmental factors influencing the human factor H plasma levels." Immunogenetics **56**(2): 77-82.

17. Esparza-Gordillo, J., E. Goicoechea de Jorge, A. Buil, L. C. Berges, M. Lopez-Trascasa, P. Sanchez-Corral, S. Rodriguez de Cordoba (2005). "Predisposition to atypical hemolytic uremic syndrome involves the concurrence of different susceptibility alleles in the regulators of complement activation gene cluster in 1q32." Hum Mol Genet **14**(5): 703-712.
18. Esparza-Gordillo, J., J. Soria, A. Buil, L. Almasy, J. Blangero, J. Fontcuberta, S. Rodríguez de Córdoba (2004). "Genetic and environmental factors influencing the human factor H plasma levels." Immunogenetics **56**(2): 77-82.
19. Estaller, C., E. H. Weiss, W. Schwaebler, D. (1991). "Human complement factor H: two factor H proteins are derived from alternatively spliced transcripts." Eur J Immunol **21**(3): 799-802.
20. Ferreira, V. P., A. P. Herbert, H. G. Hocking, P. N. Barlow, M. K. Pangburn (2006). "Critical Role of the C-Terminal Domains of Factor H in Regulating Complement Activation at Cell Surfaces." J Immunol **177**(9): 6308-6316.
21. Fremeaux-Bacchi, V., M. A. Dragon-Durey, J. Blouin, C. Vigneau, D. Kuypers, B. Boudailliez, C. Loirat, E. Rondeau, W. H. Fridman (2004). "Complement factor I: a susceptibility gene for atypical haemolytic uraemic syndrome." J Med Genet **41**(6): e84-.
22. Fremeaux-Bacchi, V., T. Goodship, C. H. Regnier, M. A. Dragon-Durey, B. Janssen, J. Atkinson (2007). "Mutations in complement C3 predispose to development of atypical haemolytic uraemic syndrome." Blood **110**(16): 3923.
23. Fritsche, L. G., N. Lauer, A. Hartmann, S. Stippa, C. N. Keilhauer, M. Oppermann, M. K. Pandey, J. Köhl, P. F. Zipfel, B. H. F. Weber, C. Skerka (2010). "An imbalance of human complement regulatory proteins CFHR1, CFHR3 and factor H influences risk for age-related macular degeneration (AMD)." Hum Mol Genet.
24. Gasser, C, E. Gautier, A. Steck, R. E. Siebermann. (1955). "Hemolytic-uremic syndrome: bilateral necrosis of the renal cortex in acute acquired hemolytic anemia." Schweiz Med Wochenschr **85**(38-39): 905-909.
25. Goicoechea de Jorge, E., C. L. Harris, J. Esparza-Gordillo, L. Carreras, E. A. Arranz, C. A. Garrido, M. Lopez-Trascasa, P. Sanchez-Corral, B. P. Morgan, S. Rodriguez de Cordoba (2007). "Gain-of-function mutations in complement factor B are associated with atypical hemolytic uremic syndrome." Proc Natl Acad Sci **104**(1): 240-245.
26. Gold, B., J. E. Merriam, J. Zernant, L. S. Hancox, A. J. Taiber, K. Gehrs, K. Cramer, J. Neel, J. Bergeron, G. R. Barile, R. T. Smith, G. S. Hageman, M. Dean, R. Allikmets (2006). "Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration." Nat Genet **38**(4): 458-462.
27. Gordon, D. L., R. M. Kaufman, T. K. Blackmore, J. Kwong, D. M. Lublin (1995). "Identification of complement regulatory domains in human factor H." J Immunol **155**(1): 348-356.
28. Gros, P., F. J. Milder, B. J. C. Janssen (2008). "Complement driven by conformational changes." Nat Rev Immunol **8**(1): 48-58.
29. Harris, C. L., R. J. M. Abbott, R. A. Smith, B. P. Morgan, S. M. Lea (2005). "Molecular Dissection of Interactions between Components of the Alternative Pathway of Complement and Decay Accelerating Factor (CD55)." The Journal of Biological Chemistry **280**(4): 2569-2578.
30. Harris, C. L., D. M. Pettigrew, S. M. Lea, B. P. Morgan (2007). "Decay-Accelerating Factor Must Bind Both Components of the Complement Alternative Pathway C3 Convertase to Mediate Efficient Decay." J Immunol **178**(1): 352-359.
31. Heinen, S., A. Hartmann, N. Lauer, U. Wiehl, H.-M. Dahse, S. Schirmer, K. Gropp, T. Enghardt, R. Wallich, S. Halbach, M. Mihlan, U. Schlotzer-Schrehardt, P. F. Zipfel, C. Skerka (2009). "Factor H-related protein 1 (CFHR-1) inhibits complement C5 convertase activity and terminal complex formation." Blood **114**(12): 2439-2447.
32. Heinen, S., P. Sanchez-Corral, M. Jackson, L. Strain, J. Goodship, E. Kemp, C. Skerka, T. Jokiranta, K. Meyers, E. Wagner, P. Robitaille, J. Esparza-Gordillo, S. Rodriguez de Cordoba, P. Zipfel, T. Goodship (2006). "De novo gene conversion in the RCA gene cluster (1q32) causes mutations in complement factor H associated with atypical hemolytic uremic syndrome." Hum Mut **27**(3): 292-293.
33. Hellwage, J., T. S. Jokiranta, V. Koistinen, O. Vaarala, S. Meri, P. F. Zipfel (1999). "Functional properties of complement factor H-related proteins FHR-3 and FHR-4: binding to the C3d region of C3b and differential regulation by heparin." FEBS Letters **462**(3): 345-352.

34. Higgins, J. M., H. Wiedemann, R. Timpl, K. B. Reid (1995). "Characterization of mutant forms of recombinant human properdin lacking single thrombospondin type I repeats. Identification of modules important for function." J Immunol **155**(12): 5777-5785.
35. Hillarp, A., B. Dahlbäck (1988). "Novel subunit in C4b-binding protein required for protein S binding." J Biol Chem **263**(25): 12759-12764.
36. Høgåsen, K., J. H. Jansen, T. E. Mollnes, J. Hovdenes, M. Harboe (1995). "Hereditary porcine membranoproliferative glomerulonephritis type II is caused by factor H deficiency." J Clin Invest **95**(3): 1054-1061.
37. Holers, V. M. (2008). "The spectrum of complement alternative pathway-mediated diseases." Immunol Rev **223**(1): 300-316.
38. Hughes, A. E., N. Orr, H. Esfandiary, M. Diaz-Torres, T. Goodship, U. Chakravarthy (2006). "A common CFH haplotype, with deletion of CFHR1 and CFHR3, is associated with lower risk of age-related macular degeneration." Nat Genet **38**(10): 1173-1177.
39. Janssen, B. J. C., E. G. Huizinga, H. C. A. Raaijmakers, A. Roos, M. R. Daha, K. Nilsson-Ekdahl, B. Nilsson, P. Gros (2005). "Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity." Nature **437**(7058): 505-511.
40. Jozsi, M., C. Licht, S. Strobel, S. L. H. Zipfel, H. Richter, S. Heinen, P. F. Zipfel, C. Skerka (2007a). "Factor H autoantibodies in atypical hemolytic uremic syndrome correlate with CFHR1/CFHR3 deficiency." Blood: blood-2007-2009-109876.
41. Jozsi, M., C. Licht, S. Strobel, S. L. H. Zipfel, H. Richter, S. Heinen, P. F. Zipfel, C. Skerka (2008). "Factor H autoantibodies in atypical hemolytic uremic syndrome correlate with CFHR1/CFHR3 deficiency." Blood **111**(3): 1512-1514.
42. Jozsi, M., S. Strobel, H.-M. Dahse, W.-s. Liu, P. F. Hoyer, M. Oppermann, C. Skerka, P. F. Zipfel (2007b). "Anti factor H autoantibodies block C-terminal recognition function of factor H in hemolytic uremic syndrome." Blood **110**(5): 1516-1518.
43. Karmali, M. (2004). "Infection by Shiga toxin-producing Escherichia coli: an overview." Mol Biotechnol **26**(2): 117-122.
44. Katschke, K. J., S. Stawicki, J. Yin, M. Steffek, H. Xi, L. Sturgeon, P. E. Hass, K. M. Loyet, L. DeForge, Y. Wu, M. van Lookeren Campagne, C. Wiesmann (2009). "Structural and Functional Analysis of a C3b-specific Antibody That Selectively Inhibits the Alternative Pathway of Complement." J Biol Chem **284**(16): 10473-10479.
45. Kavanagh, D., R. Burgess, D. Spitzer, A. Richards, M. L. Diaz-Torres, J. A. Goodship, D. E. Hourcade, J. P. Atkinson, T. H. J. Goodship (2007). "The decay accelerating factor mutation I197V found in hemolytic uraemic syndrome does not impair complement regulation." Molecular Immunology **44**(12): 3162-3167.
46. Kavanagh, D., E. J. Kemp, E. Mayland, R. J. Winney, J. S. Duffield, G. Warwick, A. Richards, R. Ward, J. A. Goodship, T. H. J. Goodship (2005). "Mutations in Complement Factor I Predispose to Development of Atypical Hemolytic Uremic Syndrome." J Am Soc Nephrol **16**(7): 2150-2155.
47. Kavanagh, D., A. Richards, J. Atkinson (2008a). "Complement Regulatory Genes and Hemolytic Uremic Syndromes." Annu Rev Med **59**(1): 293-309.
48. Kavanagh, D., A. Richards, M. Noris, R. Hauhart, M. K. Liszewski, D. Karpman, J. A. Goodship, V. Fremeaux-Bacchi, G. Remuzzi, T. H. J. Goodship, J. P. Atkinson (2008b). "Characterization of mutations in complement factor I (CFI) associated with hemolytic uremic syndrome." Molecular Immunology **45**(1): 95-105.
49. Khera, R., N. Das (2009). "Complement Receptor 1: Disease associations and therapeutic implications." Mol Immunol **46**(5): 761-772.
50. Krarup, A., R. Wallis, J. S. Presanis, P. Gál, R. B. Sim (2007). "Simultaneous Activation of Complement and Coagulation by MBL-Associated Serine Protease 2." PLoS ONE **2**(7): e623.
51. Kuhn, S., C. Skerka, P. F. Zipfel (1995). "Mapping of the complement regulatory domains in the human factor H-like protein 1 and in factor H1." J Immunol **155**(12): 5663-5670.
52. Kuttner-Kondo, L., D. E. Hourcade, V. E. Anderson, N. Muqim, L. Mitchell, D. C. Soares, P. N. Barlow, M. E. Medof (2007). "Structure-based Mapping of DAF Active Site Residues That Accelerate the Decay of C3 Convertases." J Biol Chem **282**(25): 18552-18562.
53. Licht, C., S. Heinen, M. Jozsi, I. Loschmann, R. E. Saunders, S. J. Perkins, R. Waldherr, C. Skerka, M.

- Kirschfink, B. Hoppe, P. F. Zipfel (2006). "Deletion of Lys224 in regulatory domain 4 of Factor H reveals a novel pathomechanism for dense deposit disease (MPGN II)." *Kidney Int* **70**(1): 42-50.
54. Liszewski, M. K., M. K. Leung, B. Schraml, T. H. J. Goodship, J. P. Atkinson (2007). "Modeling how CD46 deficiency predisposes to atypical hemolytic uremic syndrome." *Mol Immunol* **44**(7): 1559-1568.
55. Liszewski, M. K., T. W. Post, J. P. Atkinson (1991). "Membrane Cofactor Protein (MCP or CD46): Newest Member of the Regulators of Complement Activation Gene Cluster." *Annu Rev Immunol* **9**(1): 431-455.
56. Maller, J. B., J. A. Fagerness, R. C. Reynolds, B. M. Neale, M. J. Daly, J. M. Seddon (2007). "Variation in complement factor 3 is associated with risk of age-related macular degeneration." *Nat Genet* **39**(10): 1200-1201.
57. Manuelian, T., J. Hellwage, S. Meri, J. Caprioli, M. Noris, S. Heinen, M. Jozsi, H. P. H. Neumann, G. Remuzzi, P. F. Zipfel (2003). "Mutations in factor H reduce binding affinity to C3b and heparin and surface attachment to endothelial cells in hemolytic uremic syndrome." *J Clin Invest* **111**(8): 1181-1190.
58. Martínez-Barricarte, R., M. Heurich, F. Valdes-Cañedo, E. Vazquez-Martul, E. Torreira, T. Montes, A. Tortajada, S. Pinto, M. Lopez-Trascasa, B. P. Morgan, O. Llorca, C. L. Harris, S. Rodríguez de Córdoba (2010a). "Human C3 mutation reveals a mechanism of dense deposit disease pathogenesis and provides insights into complement activation and regulation." *J Clin Invest* **0**(0): 0-0.
59. Martínez-Barricarte, R., M. Heurich, F. Valdes-Cañedo, E. Vazquez-Martul, E. Torreira, T. Montes, A. Tortajada, S. Pinto, M. Lopez-Trascasa, B. P. Morgan, O. Llorca, C. L. Harris, S. Rodríguez de Córdoba (2010b). "Human C3 mutation reveals a mechanism of dense deposit disease pathogenesis and provides insights into complement activation and regulation." *J Clin Invest* **120**(10): 3702-3712.
60. McRae, J. L., P. J. Cowan, D. A. Power, K. I. Mitchelhill, B. E. Kemp, B. P. Morgan, B. F. Murphy (2001). "Human Factor H-related Protein 5 (FHR-5). A NEW COMPLEMENT-ASSOCIATED PROTEIN." *J Biol Chem* **276**(9): 6747-6754.
61. McRae, J. L., T. G. Duthy, K. M. Griggs, R. J. Ormsby, P. J. Cowan, B. A. Cromer, W. J. McKinstry, M. W. Parker, B. F. Murphy, D. L. Gordon (2005). "Human Factor H-Related Protein 5 Has Cofactor Activity, Inhibits C3 Convertase Activity, Binds Heparin and C-Reactive Protein, and Associates with Lipoprotein." *J Immunol* **174**(10): 6250-6256.
62. Milder, F. J., L. Gomes, A. Schouten, B. J. C. Janssen, E. G. Huizinga, R. A. Romijn, W. Hemrika, A. Roos, M. R. Daha, P. Gros (2007). "Factor B structure provides insights into activation of the central protease of the complement system." *Nat Struct Mol Biol* **14**(3): 224-228.
63. Misasi R, Huemer HP, Schwaebler W, Sölder E, L. C, D. MP (1989). "Human complement factor H: An additional gene product of 43kDa isolated from human plasma shows cofactor activity for the cleavage of the third component of complement." *Eur J Immunol* **19**(9): 1765-1768.
64. Monteferrante, G., S. Brioschi, J. Caprioli, G. Pianetti, P. Bettinaglio, E. Bresin, G. Remuzzi, M. Noris (2007). "Genetic analysis of the complement factor H related 5 gene in haemolytic uraemic syndrome." *Mol Immunol* **44**(7): 1704-1708.
65. Montes, T., A. Tortajada, B. P. Morgan, S. Rodríguez de Córdoba, C. L. Harris (2009). "Functional basis of protection against age-related macular degeneration conferred by a common polymorphism in complement factor B." *Proc Natl Acad Sci* **106**(11): 4366-4371.
66. Muller-Eberhard, H. J. (1986). "The Membrane Attack Complex of Complement." *Annu Rev Immunol* **4**(1): 503-528.
67. Murphy, B., T. Georgiou, D. Machet, P. Hill, J. McRae (2002). "Factor H-related protein-5: A novel component of human glomerular immune deposits." *Am J Kidney Dis* **39**(1): 24-27.
68. Nilsson, S. C., D. Karpman, F. Vaziri-Sani, A.-C. Kristoffersson, R. Salomon, F. Provot, V. Fremeaux-Bacchi, L. A. Trouw, A. M. Blom (2007). "A mutation in factor I that is associated with atypical hemolytic uremic syndrome does not affect the function of factor I in complement regulation." *Mol Immunol* **44**(8): 1835-1844.
69. Noris, M., G. Remuzzi (2005). "Hemolytic Uremic Syndrome." *Lancet* **16**(4): 1035-1050.
70. Pangburn, M., H. Müller-Eberhard (1986). "The C3 convertase of the alternative pathway of human complement. Enzymic properties of the bimolecular proteinase." *Biochem J* **235**(3): 723-730.
71. Park, C. T., S. D. Wright (1996). "Plasma Lipopolysaccharide-binding Protein Is Found Associated with a Particle Containing



- Apolipoprotein A-I, Phospholipid, and Factor H-related Proteins." *J Biol Chem* **271**(30): 18054-18060.
72. Perdikoulis, M. V., U. Kishore, K. B. M. Reid (2001). "Expression and characterisation of the thrombospondin type I repeats of human properdin." *Biochim Biophys Acta* **1548**(2): 265-277.
73. Perez-Caballero, D., C. Gonzalez-Rubio, M. E. Gallardo, M. Vera, M. Lopez-Trascasa, S. Rodriguez de Cordoba, P. Sanchez-Corral (2001). "Clustering of Missense Mutations in the C-Terminal Region of Factor H in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome." *Am J Hum Genet* **68**: 478-484.
74. Pickering, M. C., H. T. Cook, J. Warren, A. E. Bygrave, J. Moss, M. J. Walport, M. Botto (2002). "Uncontrolled C3 activation causes membranoproliferative glomerulonephritis in mice deficient in complement factor H." *Nat Genet* **31**(4): 424-428.
75. Pickering, M. C., E. Goicoechea de Jorge, R. Martinez-Barricarte, S. Recalde, A. Garcia-Layana, K. L. Rose, J. Moss, M. J. Walport, H. T. Cook, S. Rodriguez de Cordoba, M. Botto (2007). "Spontaneous hemolytic uremic syndrome triggered by complement factor H lacking surface recognition domains." *J Exp Med* **204**(6): 1249-1256.
76. Pickering, M. C., J. Warren, K. L. Rose, F. Carlucci, Y. Wang, M. J. Walport, H. T. Cook, M. Botto (2006). "Prevention of C5 activation ameliorates spontaneous and experimental glomerulonephritis in factor H-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci* **103**(25): 9649-9654.
77. Richards, A., M. Buddles, R. Donne, B. Kaplan, E. Kirk, M. Venning, C. Tielemans, J. Goodship, T. H. Goodship (2001). "Factor H Mutations in Hemolytic Uremic Syndrome Cluster in Exons 1820, a Domain Important for Host Cell Recognition." *Am J Hum Genet* **68**: 485-490.
78. Richards, A., M. Kathryn Liszewski, D. Kavanagh, C. J. Fang, E. Moulton, V. Fremaux-Bacchi, G. Remuzzi, M. Noris, T. H. J. Goodship, J. P. Atkinson (2007). "Implications of the initial mutations in membrane cofactor protein (MCP; CD46) leading to atypical hemolytic uremic syndrome." *Mol Immunol* **44**(1-3): 111-122.
79. Richards, A., E. J. Kemp, M. K. Liszewski, J. A. Goodship, A. K. Lampe, R. Decorte, M. H. Muslumanoglu, S. Kavukcu, G. Filler, Y. Pirson, L. S. Wen, J. P. Atkinson, T. H. J. Goodship (2003). "Mutations in human complement regulator, membrane cofactor protein (CD46), predispose to development of familial hemolytic uremic syndrome." *Proc Natl Acad Sci* **100**(22): 12966-12971.
80. Ripoché, J., A. Day, T. Harris, R. Sim (1988). "The complete amino acid sequence of human complement factor H." *Biochem J* **249**(2): 593-602.
81. Rodríguez de Córdoba, S., M. Díaz-Guillén, D. Heine-Suñer (1999). "An integrated map of the human regulator of complement activation (RCA) gene cluster on 1q32." *Mol Immunol* **36**(13-14): 803-808.
82. Rodríguez de Córdoba, S., J. Esparza-Gordillo, E. Goicoechea de Jorge, M. Lopez-Trascasa, P. Sanchez-Corral (2004). "The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations." *Mol Immunol* **41**(4): 355-367.
83. Rodríguez de Córdoba, S., E. Goicoechea de Jorge (2008). "Translational Mini-Review Series on Complement Factor H: Genetics and disease associations of human complement factor H." *Clin Exp Immunol* **151**(1): 1-13.
84. Rodríguez de Córdoba, S., D. M. Lublin, P. Rubinstein, J. P. Atkinson (1985). "Human genes for three complement components that regulate the activation of C3 are tightly linked." *J Exp Med* **161**(5): 1189-1195.
85. Rooijakkers, S. H. M., J. Wu, M. Ruyken, R. van Domselaar, K. L. Planken, A. Tzekou, D. Ricklin, J. D. Lambris, B. J. C. Janssen, J. A. G. van Strijp, P. Gros (2009). "Structural and functional implications of the alternative complement pathway C3 convertase stabilized by a staphylococcal inhibitor." *Nat Immunol* **10**(7): 721-727.
86. Rose, K. L., D. Paixao-Cavalcante, J. Fish, A. P. Manderson, T. H. Malik, A. E. Bygrave, T. Lin, S. H. Sacks, M. J. Walport, H. T. Cook, M. Botto, M. C. Pickering (2008). "Factor I is required for the development of membranoproliferative glomerulonephritis in factor H-deficient mice." *J Clin Invest* **118**(2): 608-618.
87. Schmidt, C. Q., A. P. Herbert, D. Kavanagh, C. Gandy, C. J. Fenton, B. S. Blaum, M. Lyon, D. Uhrin, P. N. Barlow (2008). "A New Map of Glycosaminoglycan and C3b Binding Sites on Factor H." *J Immunol* **181**(4): 2610-2619.
88. Schwaebble, W., J. Zwirner, T.F. Schulz, R.P. Linke, M.P. Dierich. (1987). "Human complement factor H: expression of an additional truncated gene product of 43 kDa in human liver." *Eur J Immunol* **17**(10): 1485-1489.

89. Skerka, C., J. Hellwage, W. Weber, A. Tilkorn, F. Buck, T. Marti, E. Kampen, U. Beisiegel, P. F. Zipfel (1997). "The Human Factor H-related Protein 4(FHR-4). A NOVEL SHORT CONSENSUS REPEAT-CONTAINING PROTEIN IS ASSOCIATED WITH HUMAN TRIGLYCERIDE-RICH LIPOPROTEINS." J Biol Chem **272**(9): 5627-5634.
90. Skerka, C., M. Józsi, P. Zipfel, M. Dragon-Durey, V. Fremeaux-Bacchi (2009). "Autoantibodies in haemolytic uraemic syndrome (HUS)." Thromb Haemost **101**(2): 227-232.
91. Spitzer, D., L. Mitchell, J. Atkinson, D. Hourcade (2007). "Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for de novo convertase assembly." J Immunol **179**(4): 2600-2608.
92. Stahl, A., F. Vaziri-Sani, S. Heinen, A.-C. Kristoffersson, K.-H. Gydell, R. Raafat, A. Gutierrez, O. Beringer, P. F. Zipfel, D. Karpman (2008). "Factor H dysfunction in patients with atypical hemolytic uremic syndrome contributes to complement deposition on platelets and their activation." Blood **111**(11): 5307-5315.
93. Tara, K. M., J. N. Carla, E. W. Amy, L. F. Kathy, J. H. S. Richard (2010). "Mutations in alternative pathway complement proteins in American patients with atypical hemolytic uremic syndrome." Hum Mut **31**(6): E1445-E1460.
94. Trouw, L. A., A. A. Bengtsson, K. A. Gelderman, B. Dahlbäck, G. Sturfelt, A. M. Blom (2007). "C4b-binding Protein and Factor H Compensate for the Loss of Membrane-bound Complement Inhibitors to Protect Apoptotic Cells against Excessive Complement Attack." J Biol Chem **282**(39): 28540-28548.
95. Venables, J. P., L. Strain, D. Routledge, D. Bourn, H. M. Powell, P. Warwicker, M. L. Diaz-Torres, A. Sampson, P. Mead, M. Webb, Y. Pirson, M. S. Jackson, A. Hughes, K. M. Wood, J. A. Goodship, T. H. J. Goodship (2006). "Atypical Haemolytic Uraemic Syndrome Associated with a Hybrid Complement Gene." PLoS Med **3**(10): 836-844.
96. Walport, M. J. (2001). "Complement- First of Two Parts." N Engl J Med **344**(14): 1058-1066.
97. Warwicker, P., T. H. J. Goodship, R. L. Donne, Y. Pirson, A. Nicholls, R. M. Ward, P. Turnpenny, J. A. Goodship (1998). "Genetic studies into inherited and sporadic hemolytic uremic syndrome." Kidney Int **53**(4): 836-844.
98. Wu, J., Y.-Q. Wu, D. Ricklin, B. J. C. Janssen, J. D. Lambris, P. Gros (2009). "Structure of complement fragment C3b-factor H and implications for host protection by complement regulators." Nat Immunol **10**(7): 728-733.
99. Yates, J. R. W., T. Sepp, B. K. Matharu, J. C. Khan, D. A. Thurlby, H. Shahid, D. G. Clayton, C. Hayward, J. Morgan, A. F. Wright, A. M. Armbricht, B. Dhillon, I. J. Deary, E. Redmond, A. C. Bird, A. T. Moore, A. M. D. S. G. the Genetic Factors in (2007). "Complement C3 Variant and the Risk of Age-Related Macular Degeneration." N Engl J Med **357**(6): 553-561.
100. Zipfel, P., T. Jokiranta, J. Hellwage, V. Koistinen, S. Meri (1999). "The factor H protein family." Immunopharmacol **42**(1-3): 53-60.
101. Zipfel, P. F., M. Edey, S. Heinen, oacute, M. zsi, aacute, ly, H. Richter, J. Misselwitz, B. Hoppe, D. Routledge, L. Strain, A. E. Hughes, J. A. Goodship, C. Licht, T. H. J. Goodship, C. Skerka (2007). "Deletion of Complement Factor H Related Genes CFHR1 and CFHR3 Is Associated with Atypical Hemolytic Uremic Syndrome." PLoS Genet **3**(3): 387-392.





# Abreviaturas



aHUS	<u>A</u> typical <u>H</u> aemolitic <u>U</u> raemic <u>S</u> ndrome
AMD	<u>A</u> ge-related <u>M</u> acular <u>D</u> egeneration
ANA	<u>A</u> nafilotoxina
AP	<u>A</u> lternative <u>P</u> athway
C345C	<u>C</u> omplement <u>C</u> 3, <u>C</u> 4 and <u>C</u> 5 <u>C</u> -terminal
C3nef	<u>C</u> 3 factor <u>N</u> efrítico
C4BP	<u>C</u> 4b- <u>B</u> inding <u>P</u> rotein
CFB	Gen codificante de factor <u>B</u>
CFH	Gen codificante de factor <u>H</u>
CFHR1-5	<u>CFH</u> <u>R</u> elated <u>1</u> - <u>5</u>
CFI	Gen codificante de factor <u>I</u>
CP	<u>C</u> lasical <u>P</u> athway
CR1	<u>C</u> omplement <u>R</u> eceptor type <u>1</u>
CR2	<u>C</u> omplement <u>R</u> eceptor type <u>2</u>
CUB	<u>C</u> omplement C1r/C1s, <u>U</u> EGF, <u>B</u> MP1
DAF	<u>D</u> ecay <u>A</u> celerating <u>F</u> actor
DDD	<u>D</u> ense <u>D</u> eposit <u>D</u> isease
ELISA	<u>E</u> nzyme- <u>L</u> inked <u>I</u> mmunosorbent <u>A</u> ssay
fB	<u>F</u> actor <u>B</u>
fD	<u>F</u> actor <u>D</u>
fH	<u>F</u> actor <u>H</u>
FHL1	<u>F</u> actor <u>H</u> <u>L</u> ike <u>1</u>
fI	<u>F</u> actor <u>I</u>
fP	Properdina
GPI	<u>G</u> licosil <u>P</u> hosfatidylinositol
LHR	<u>L</u> ong <u>H</u> omologous <u>R</u> epeats
LP	<u>L</u> ectin <u>P</u> athway
MAC	<u>M</u> embrane <u>A</u> ttack <u>C</u> omplex
MBP	<u>M</u> anose <u>B</u> inding <u>P</u> rotein
MCP	<u>M</u> embrane <u>C</u> ofactor <u>P</u> rotein
MG	<u>M</u> acroglobulina
MLPA	<u>M</u> ultiplex <u>L</u> igation- <u>D</u> ependent <u>P</u> robe <u>A</u> mplification
MPGN2	<u>M</u> embranoproliferative <u>G</u> lomerulonephritis type <u>2</u>
PCR	<u>P</u> olimerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
RCA	<u>R</u> egulators of <u>C</u> omplement <u>A</u> ctivation
SCR	<u>S</u> hort <u>C</u> onsensus <u>R</u> epeats
SNP	<u>S</u> ingle <u>N</u> ucleotide <u>P</u> olymorphism
SRP	<u>S</u> urface <u>P</u> lasmon <u>R</u> esonance
TED	<u>T</u> hioester- <u>C</u> ontaining <u>D</u> omain
TSR	<u>T</u> rombospodin type 1
VWA	<u>V</u> on <u>W</u> illebrand factor <u>A</u>
$\alpha'$ NT	<u>N</u> -terminous of the <u><math>\alpha</math></u> -chain



# Anexo

Los artículos que se adjuntan a continuación no se han discutido en esta tesis.

1. Pickering MC, Goicoechea de Jorge E, **Martínez-Barricarte R**, Recalde S, Garcia-Layana A, Rose KL, Moss J, Walport MJ, Cook HT, Rodríguez de Córdoba S and others. (2007). "Spontaneous hemolytic uremic syndrome triggered by complement factor H lacking surface recognition domains". *J Exp Med*. **204**(6):1249-1256.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17517971>

2. Moreno-Navarrete JM, **Martínez-Barricarte R**, Catalán V, Sabater M, Gómez-Ambrosi J, Ortega FJ, Ricart W, Blüher M, Frühbeck G, Rodríguez de Córdoba S and others. (2010). "Complement Factor H Is Expressed in Adipose Tissue in Association With Insulin Resistance". *Diabetes* **59**(1):200-209.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19833879>

## Síndrome hemolítico urémico espontáneo desencadenado por un factor H sin sus dominios de reconocimiento de superficies.

M. C. Pickering, E. Goicoechea de Jorge, **R. Martínez-Barricarte**, S. Recalde, A. García-Layana, K. L. Rose, J. Moss, M. J. Walport, H. T. Cook, S. Rodríguez de Córdoba y M. Botto.

Factor H es una abundante glicoproteína plasmática que regula la AP del complemento evitando la activación inespecífica de C3 y el daño no específico sobre las células del propio organismo. AMD, aHUS y MPGN2 están asociadas con polimorfismos y mutaciones en *CFH* sugiriendo una correlación fenotipo-genotipo. Por un lado AMD y MPGN2 comparten similitudes patológicas como es la acumulación de debris que contienen componentes del complemento en el ojo y riñón respectivamente, mientras que aHUS se caracteriza por daño del endotelio renal. Esta diferencia patológica se ve reflejada en nuestro estudio de asociación con el gen de fH que demostró que a pesar de que AMD y MPGN2 comparten haplotipos

de riesgo en CFH el haplotipo de riesgo para aHUS es distinto. Por otro lado, los ratones deficientes de fH sufren activación incontrolada de C3 en plasma y desarrollan espontáneamente MPGN2 pero no aHUS. Nuestros estudios muestran que estos ratones, cuando expresan transgénicamente un fH que simula las mutaciones asociadas con aHUS, regulan la activación de C3 en plasma desarrollando aHUS pero no MPGN2. Estos animales representan el primer modelo de aHUS y ofrecen una evidencia *in vivo* de que la regulación efectiva del C3 en plasma y, el defecto en el control de la activación del complemento en el endotelio renal, son eventos críticos en la patogénesis molecular de aHUS asociada con defectos en fH.



## El factor H del complemento es expresado en tejido adiposo en asociación con resistencia a insulina.

J. María Moreno-Navarrete, R. Martínez-Barricarte, V. Catalán, M. Sabater, J. Gómez-Ambrosi, F. J. Ortega, W. Ricart, M. Blüher, G. Frühbeck, S. Rodríguez de Córdoba y J. M. Fernández-Real.

**Objetivo.** La activación de la AP del sistema del complemento, del cual fH es su regulador principal, se ha sugerido que está asociado con obesidad y desórdenes metabólicos. Nuestro objetivo era estudiar la asociación entre los niveles de fH y fB circulante y su expresión en adipositos, con obesidad y resistencia a insulina.

**Diseño de investigación y métodos.** Los niveles de fH y fB circulantes fueron analizados mediante ELISA en 398 sujetos. La expresión de CFH y CFB se evaluó en 76 muestras de tejido adiposo, adipocitos aislados y en células estromovasculares (n=13). Los efectos de la pérdida de peso y del rosiglitazone fueron investigados en cohortes independientes.

**Resultados.** Los niveles en circulación de fB y fH estaban asociados positivamente con el índice de masa corporal, circunferencia de la muñeca, triglicéridos y parámetros inflamatorios y negativamente con la sensibilidad a insulina y el colesterol HDL. Por primera vez, la expresión del

gen CFH fue detectada en tejido adiposo humano (aumentado significativamente en tejido adiposo subcutáneo con respecto al omental). La expresión de CFH en tejido omental estaba significativamente asociada con resistencia a insulina. Por el contrario, la expresión de CFB estaba significativamente aumentada en tejido omental pero también en asociación con ayuno de glucosa y triglicéridos. La fracción estromovascular era la responsable de estas diferencias, a pesar de que los adipocitos aislados expresaban fB y fH a bajo nivel. Tanto la pérdida de peso como el rosiglitazone conducían a una bajada en los niveles de fB y fH.

**Conclusiones.** Elevados niveles de fH y fB circulantes en sujetos con la tolerancia a la glucosa alterada, muestran un aumento de la activación de la AP del complemento inducida por las células estromovasculares en tejido adiposo omental asociado con resistencia a insulina y desequilibrios metabólicos.